

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Interaktion von Chromatin-remodellierenden
Faktoren mit dem E1A_{12S}-Onkoprotein des
Adenovirus Serotyp 12**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Rozita Hashemi
aus Teheran

Juli 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

2. Gutachter: PD. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. T. Möröy

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2003

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Adenovirus-Wirtszell-Modellsystem	1
1.2 Adenoviren	2
1.2.1 Die produktive Infektion	3
1.2.2 Die abortive Infektion	5
1.3 Struktur und Proteine der E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12	6
1.4 Kontrolle der Genexpression durch E1A-Proteine	7
1.5 Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression	11
1.6 Histonacetylierung	13
1.7 Energie-abhängige Änderungen der Chromatinstruktur	15
1.8 Interaktion der E1A-Proteine mit den Chromatin-remodellierenden Faktoren	18
1.9 Zielsetzung	19
2. Material	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Enzyme	21
2.3 Antikörper	22
2.4 Nukleinsäuren	22
2.5 Oligonukleotide	23
2.6 Molekulargewichtstandards	23
2.7 Verwendete Vektoren	24

2.7.1	Reporterplasmide	24
2.7.2	Expressionsplasmide	24
2.8	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	25
2.9	Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	25
2.10	Spezielle Laborgeräte	26
2.11	Kits und spezielle Reagenzien	26
2.12	Radiochemikalien	27
2.13	Puffer und Lösungen	27
2.14	Bakterienstämme	31
2.15	Zelllinien	31
3.	Methoden	32
3.1	Allgemeine Methoden	32
3.2	Zellkultur	32
3.3	Transfektion eukaryontischer Zellen	33
3.3.1	Lipofektion	33
3.3.2	Elektroporation	33
3.4	Isolierung von Plasmid-DNA	34
3.5	Aufreinigung und Klonierung von Nukleinsäuren	34
3.6	Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR (PCR-Screening)	34
3.7	Transformation von Bakterien	35
3.7.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	35
3.7.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	35
3.8	DNA-Quantifizierung	35
3.9	Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.10	Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten	36

3.11	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten	36
3.12	Präparation von Kernextrakt	37
3.13	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	37
3.14	<i>In vitro</i> Transkriptions/Translations-System	38
3.15	Analyse von Proteinen	39
3.15.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.15.2	Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)	39
3.15.3	Fluorographie	40
3.16	GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen	40
3.17	Immunpräzipitation	41
3.18	DNA-Protein-Interaktionsanalysen	42
3.18.1	Chromatin-Immunpräzipitation	42
4.	Ergebnisse	44
4.1	Der E2_{Ad12}-Promotor als Modellsystem	44
4.2	ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Faktoren sind an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt	46
4.3	Die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein und hBRG1 ist abhängig vom N-Terminus und der CR1-Domäne des adenoviralen Proteins	50
4.4	Das E1A_{12S}-Protein bindet in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne an hBRG1 <i>in vitro</i>	51
4.5	Die Interaktion von hBRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein ist abhängig von der HC- und der ATPase-Domäne des hBRG1-Proteins	53
4.6	Die E1A_{12S}/hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors wird durch die Expression von hBRG1-Proteinmutanten inhibiert	55
4.7	Die ATPase-Untereinheit BRG1 der hSWI/SNF-Komplexe interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein <i>in vivo</i>	57

4.8	hBRG1 ist an der PKA-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt	60
4.9	Die ATPase-Untereinheiten BRG1 und BRM der hSWI/SNF-Komplexe tragen zu der PKA-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in hBRG1- und hBRM-defizienten Zelllinien bei	62
4.10	hBRG1 assoziiert an den E2_{Ad12}-Promotor <i>in vivo</i>	64
4.11	Die Histondeacetylase-1 inhibiert die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors	69
4.12	Die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor wird durch die Aktivität des CBP-Inhibitors Roscovitine und die Histondeacetylase-1 inhibiert	72
5.	Diskussion	75
5.1	Die ATPase-Untereinheit BRG1 der hSWI/SNF-Komplexe interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein	76
5.2	Regulation der Genexpression durch das E1A_{12S}-Protein und hSWI/SNF-Komplexe	79
5.3	Der hSWI/SNF-abhängige Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors	83
6.	Zusammenfassung	91
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Publikationen	109
9.	Lebenslauf	110
10.	Erklärungen	111

Abkürzungen

A	Ampere
As	Aminosäure
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel; 1 Bq = 1 Zerfall pro Sekunde
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie; 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cpm	counts per minute (Zerfallereignisse pro Minute)
CR	Conserved Regions (konservierte Regionen der E1A-Region der Adenoviren)
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA (heterogene Kern-RNA)

HPO	Horseradish Peroxydase (Meerrettich-Peroxydase)
HPV	Human Papilloma Virus (humanes Papillomavirus)
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
LB	Luria-Bertania
M	Molarität (mol/l)
min	Minute
mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered-Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC-Puffer	Protein Couple-Puffer
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate
TBS	Tris-Buffered-Saline (trisgepufferte Salzlösung)
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1 U = 1 mol/min)
V	Volt
VT	Versen-Trypsin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($1 \times g = 9,81 \times \text{m/s}^2$)

In dieser Arbeit benutzte Vorsätze zur Angabe der Zehnerpotenz, mit der die Maßeinheit zu multiplizieren ist:

k	Kilo	$= 10^3$
c	Zenti	$= 10^{-2}$
m	Milli	$= 10^{-3}$
μ	Mikro	$= 10^{-6}$
n	Nano	$= 10^{-9}$

1. Einleitung

Die Aufklärung der Mechanismen der kontrollierten Genexpression sowie der Prozesse, in denen Genaktivierung eine entscheidende Rolle spielen, zählen zu den wichtigsten Aufgaben der Molekularbiologie und der Zellforschung. Die Kenntnisse über die einzelnen Faktoren und deren Zusammenspiel sind die Voraussetzung für unser Verständnis von zellulären Abläufen wie u. a. der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Regulation von Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen bis hin zur Dysregulation, dem gemeinsamen Merkmal aller zellulären Entartungen.

Parallel zur Erforschung von Interaktionen der Transkriptionsfaktoren untereinander und zu spezifischen DNA-Sequenzen, findet die Frage, wie diese Faktoren mit der im Chromatin organisierten DNA interagieren, immer größeres Interesse. Die Entdeckung zahlreicher Faktoren, die sowohl in die Transkriptionsregulation involviert als auch für die Reorganisation der Chromatinstruktur verantwortlich sind, hat entscheidend zur Bedeutung des Chromatins in der Genregulation beigetragen. Da verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass Chromatin eine Barriere für die Wechselwirkung regulatorischer Proteine mit der DNA darstellt, sind daher bei der Regulation der Genaktivierung die Interaktionen von genspezifischen Transkriptionsfaktoren mit Chromatin-remodellierenden Faktoren von besonderer Bedeutung.

1.1 Adenovirus-Wirtszell-Modellsystem

Viren besitzen weder eigene energiebildende Stoffwechselsysteme noch makromolekulare Synthesemaschinen. Um sich replizieren zu können, sind sie auf die Syntheseleistungen der infizierten Zellen angewiesen, die sie durch virale Genprodukte (Onkoproteine) zu Gunsten der eigenen Produktion modifizieren. Zu den Onkoproteinen der DNA-Tumroviren gehören z. B. die Tumor (T)-Antigene der Polyomaviren und die E1A-Proteine der Adenoviren. Da DNA-Tumroviren zumeist differenzierte, teilungsinaktive Zellen infizieren, ist folglich die Hauptfunktion viraler Onkoproteine zelluläre Prozesse und das proliferative Verhalten der Wirtszellen so zu verändern, dass eine optimale Virusreplikation möglich ist. Hierbei greifen die viralen Onkoproteine, durch die Wechselwirkung mit zellulären Faktoren, in die Kontrollmechanismen der Genexpression regulierend ein. Die Fähigkeit der Modulation der

Wirtsgenexpression macht die viralen Onkoproteine gleichzeitig zu wertvollen Werkzeugen der Analyse zellulärer Prozesse.

Tatsächlich sind in den letzten Jahren zahlreiche molekulare Vorgänge in Eukaryontenzellen, wie z. B. das Spleißen von RNA (Berk und Sharp, 1978) und die Verpackung von DNA mit Histonen in Nukleosomen (Gariglio *et al.*, 1979), mit Hilfe von Adenovirus-Wirtszellsystemen aufgeklärt worden. Durch Interaktionsstudien der E1A-Proteine mit zellulären Faktoren konnten zudem grundlegende Erkenntnisse der Regulation der eukaryontischen Genexpression (Brockmann und Esche, 1995; Berk *et al.*, 1998) sowie wichtige Einblicke in den Ablauf einer Reihe zellulärer Prozesse, wie z. B. der Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose, gewonnen werden (Gallimore und Turnell, 2001).

1.2 Adenoviren

Humanpathogene Adenoviren (Ad) zählen zur Familie der *Adenoviridae*, die sich in die Gattungen *Aviadenovirus* (Vogel-Adenoviren) und *Mastadenovirus* (Säuger-Adenoviren) gliedert (Norrby *et al.*, 1976). Obwohl sie beim Menschen scheinbar keine Tumore verursachen, gehören sie zur Gruppe der DNA-Tumoviren, da sie Nagetierzellen vollständig transformieren können. Bis heute wurden ca. 50 unterschiedliche humanpathogene Serotypen klassifiziert (Bailey und Mautner, 1994). Hinsichtlich ihres onkogenen Potentials in Nagetieren werden sie in onkogene (z. B. Ad12) und nicht-onkogene (z. B. Ad5) Serotypen eingeteilt (Wadell, 1984).

Das ikosaedrische Virion der Adenoviren ist nicht membranumschlossen und beinhaltet das Virus-Genom in Form eines linearen, doppelsträngigen DNA-Moleküls, welches mit basischen virus-kodierten Proteinen (viralen Core-Proteinen) assoziiert ist (Flint und Broker, 1981). Das Capsid des Virions setzt sich aus 240 Hexoncapsomeren und 12 Pentoncapsomeren zusammen (Philipson, 1983). Die Pentoncapsomere tragen auf ihrer Oberfläche verankerte Fiber-Proteine, die der Anheftung des Virus an spezifische Rezeptoren der Zielzelle dienen (Londberg-Holm und Philipson, 1969). Es wurde gezeigt, dass Adenoviren u. a. das CAR-Protein (Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor), eine Komponente der sog. „tight junctions“ (Cohen *et al.*, 2001), zur Adsorption an die Zelloberfläche nutzen (Roelvink *et al.* 1998). Der Eintritt des Virions in die Zelle erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über sog. „Clathrin coated pits“ (Cullan, 2001). Durch die anschließende

Freisetzung aus den Endosomen, unter Verlust der Pentoncapsomere und Fiber-Proteine, gelangt das Virus in das Cytoplasma der Wirtszelle (Greber *et al.*, 1993). Hier wird das Virus vermutlich, durch die Bindung der Hexoncapsomere entlang der Mikrotubuli, zu den Kernporen transportiert (Pastan *et al.*, 1987).

Der vollständige Zerfall der Virushülle und die Freisetzung der Virus-DNA ist ein entscheidender, irreversibler Schritt, der nur an der Kernmembran stattfindet (Greber *et al.*, 1997). An diesem Prozess sind sowohl die Proteine des Kernporenkomplexes (CAN/Nup24) als auch die Histone H1 und H1-Importfaktoren beteiligt (Trotman *et al.*, 2001). H1 kann durch die Kernporen aus dem Kern austreten und an das Virus binden. Durch das Histonprotein-Importsystem der Zelle wird die Virushülle vollständig geöffnet und der Eintritt der mit viralen Core-Proteinen komplexierten Virus-DNA in den Zellkern ermöglicht. Hierbei kommt es, unter der Entfernung von viralen Core-Proteinen, zur Verpackung der Virus-DNA mit Histonproteinen der Wirtszelle und zur Bildung einer Chromatin ähnlichen Struktur (Dery *et al.*, 1985; Shenk, 1996).

In Abhängigkeit von der Wirtszelle bestehen zwei mögliche Formen des Infektionsablaufes: die produktive Infektion z. B. von humanen Zellen und die abortive Infektion z. B. von Nagerzellen.

1.2.1 Die produktive Infektion

Bei der produktiven oder auch lytischen Infektion humaner Zellen kommt es zur Replikation der viralen DNA und der Produktion von Virusnachkommen. Nach Eintritt des Virusgenoms in den Zellkern erfolgt die Expression der viralen Gene. Gemäß dem Zeitpunkt der Expression viraler Gene wird zwischen einer frühen und einer späten Phase unterschieden (Broker *et al.*, 1984; Abb. 1).

In der frühen Phase kommt es zur Bindung des Virusgenoms an die nukleäre Matrix. Dieser Vorgang ist für die Transkription früher Gene von besonderer Bedeutung (Schaak und Shenk, 1989). Die Expression viraler Gene beginnt mit der Transkription der frühen E1-Region (unterteilt in die Transkriptionseinheiten E1A und E1B), gefolgt von der Transkription der anderen frühen Regionen (E2-E4). Die Transkription der frühen Regionen, jede jeweils unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors, erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase-II an dem jeweils codogenen DNA-Strang. Die Genprodukte dieser Regionen sind essentiell für die virale Genexpression und die virale DNA-Replikation, sowie für die

Regulation spezifischer zellulärer Gene, deren Produkte für eine effektive Virusvermehrung benötigt werden.

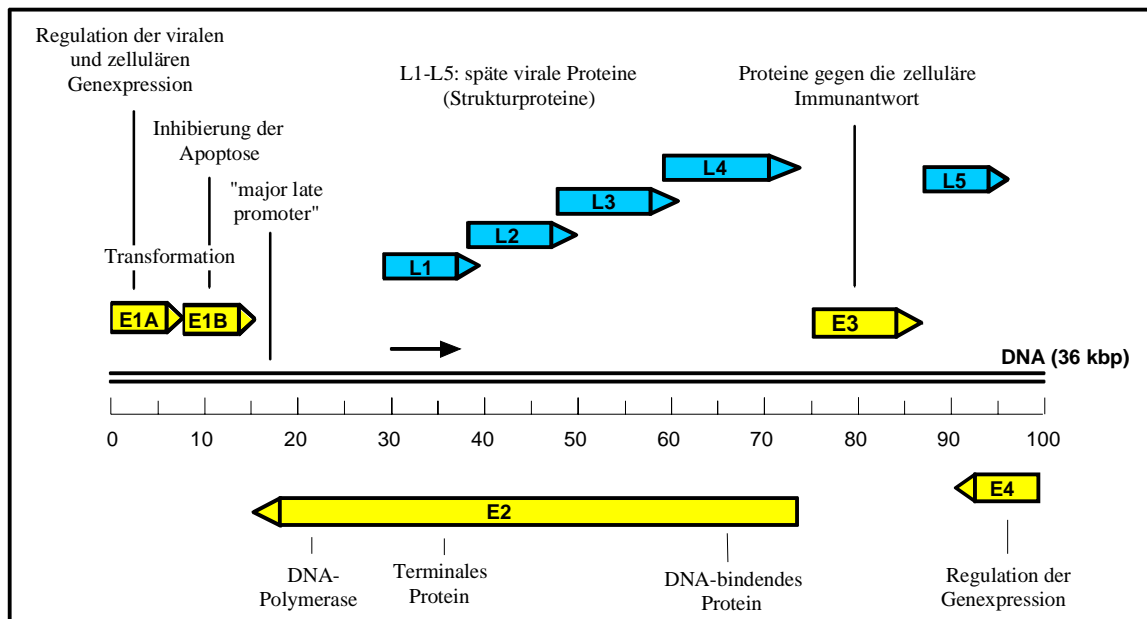


Abb. 1 Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren (nach Watson *et al.*, 1987). Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Die Transkriptionseinheiten gliedern sich in frühe (E = early; E1-E4; gelb) und späte (L = late; L1-L5; blau) Regionen. Die Regionen E1-E4 werden jeweils durch einen eigenen Promotor reguliert. Die späten Regionen L1-L5 stehen dagegen unter der Kontrolle eines einzigen, des „major late“ Promotors. Wichtige Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind der jeweiligen Region zugeordnet.

Die Proteine der E1A-Region regulieren die Expression der viralen sowie die Transkription einer Vielzahl zellulärer Gene (Brockmann und Esche, 1995). Die E1B-Region kodiert für zwei Proteine, die u. a. für die Akkumulation, die Stabilisierung, den Transport und die selektive Expression viraler mRNAs verantwortlich sind (Gabler *et al.*, 1998). Eine weitere Funktion der E1B-Proteine ist die Inhibition der E1A-induzierten Apoptose (White, 1995). Die E2-Region kodiert für Proteine, die für die Virusreplikation essentiell sind (eine virale DNA-Polymerase, ein DNA-Einzelstrang bindendes-Protein, und ein Protein, das kovalent an das 5'-Ende der beiden DNA-Stränge gebunden ist; Sussenbach und van der Vliet, 1983).

Die Produkte der E3-Region schützen die infizierten Zellen vor der zellulären Immunantwort. Sie verhindern z. B. die Translokation der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zellmembran (Burgert *et al.*, 1987) und die TNF-vermittelte Zellyse (Gooding *et al.*, 1988). Die E4-Region kodiert für Proteine, die u. a. am Spleißen, dem Transport von viraler mRNA, der Regulation der viralen und der zellulären Genexpression sowie dem Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind (Shenk, 1996).

Mit Start der Replikation der viralen DNA beginnt die späte Phase der produktiven Infektion, in der zusätzlich die späten Gene transkribiert werden (Thomas und Mathews, 1980). Aus einer nukleären Vorläufer-RNA, die von einem sog. „major late“ Promotor transkribiert wird, werden durch alternatives Spleißen über 20 späte mRNAs prozessiert, die in fünf Familien (L1-L5) unterteilt sind (Abb. 1). Die späten mRNAs kodieren für virale Strukturproteine (z. B. Capsomere, Fiber) oder deren Vorläufer und basische Proteine, die im Viruspartikel mit der Virus-DNA assoziiert sind (Flint und Broker, 1981). Der Zusammenbau der infektiösen Virionen findet im Zellkern statt (Horwitz *et al.*, 1969). Der produktive Zyklus endet mit dem Tod der Zelle und der Freisetzung von bis zu 10^4 infektiösen Viruspartikeln (Tooze, 1981).

1.2.2 Die abortive Infektion

Bei der Infektion nicht-permissiver Zellen (z. B. Nagerzellen) durchlaufen humanpathogene Adenoviren einen abortiven Zyklus, bei dem es zu keiner Bildung infektiöser Viruspartikel kommt (Doerfler, 1969). Die Virus-DNA gelangt nach der Infektion zwar in den Kern, auch werden die frühen Genregionen exprimiert, jedoch findet entweder keine Virus-DNA-Replikation und/oder Expression der späten Gene statt (Esche und Siegmann, 1982).

Bei der abortiven Infektion kann es, wie bei der produktiven Infektion, zu einer partiellen Integration des Virusgenoms in die zelluläre DNA kommen. Durch die konstitutive Expression der integrierten viralen Gene E1A und E1B kann die abortive Infektion in 10^{-6} bis 10^{-5} Fällen zur Transformation der infizierten Zelle führen (van der Eb und Bernards, 1984). Werden *in vitro* transformierte Zellen in immundefiziente Nager inokuliert, wachsen sie zu Tumoren aus. Obwohl alle Ad-Serotypen in immundefizienten Nagern Tumore induzieren können, sind nur die onkogenen Serotypen (Ad12, Ad18 und Ad31) in der Lage, auch in immunkompetenten Tieren Tumore zu erzeugen (Williams *et al.*, 1995). Mutationsanalysen mit chimären Adenoviren haben gezeigt, dass das tumorigene Potential allein durch die Funktion der E1A-Genprodukte der onkogenen Adenoviren bestimmt wird (Bernards *et al.*, 1983).

1.3 Struktur und Proteine der E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12

Die E1A-Region ist am linken Ende des Ad-Genoms lokalisiert („map units“ 1,3-4,5; Abb. 1). Durch alternatives Spleißen entstehen aus der hnRNA der E1A-Region des onkogenen Ad12 sechs unterschiedliche mRNAs, die gemäß ihren Sedimentationskoeffizienten mit 13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S bezeichnet werden (Abb. 2). Alle mRNAs weisen identische 5'- und 3'-Termini auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe, da während der Prozessierung der Vorläufer-RNA unterschiedlich große Introns eliminiert werden. Diese mRNAs kodieren für fünf verschiedene Proteine: E1A_{13S}, E1A_{12S}, E1A_{10S/11S}, E1A_{9,5S} und E1A_{9S} (Abb. 2; Brockmann *et al.*, 1990).

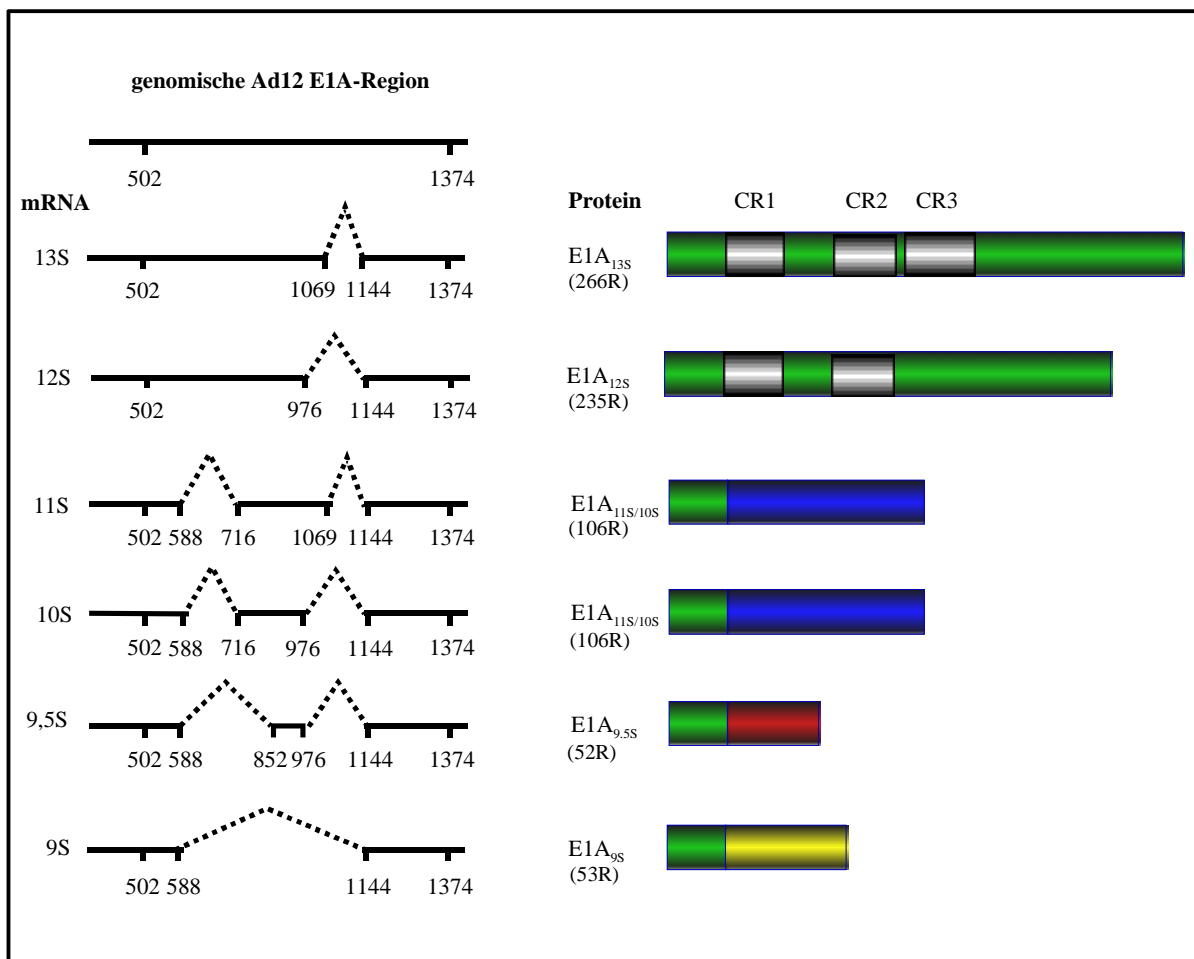


Abb. 2 Schematische Darstellung der mRNAs und davon abgeleiteter Proteine der E1A-Regionen des onkogenen Serotyps Ad12. Die Zahlen unter den Linien geben die Position der Nukleotide im adenoviralen Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und des Stopkodons. Die Rechtecke bezeichnen die von den unterschiedlichen mRNAs translatierten Proteine. Die grauen Rechtecke stellen die konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) dar. Die farbigen Rechtecke weisen auf unterschiedliche Leserahmen hin. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit (nach Brockmann *et al.*, 2001).

Die beiden hauptsächlichen Genprodukte, E1A_{13S} und E1A_{12S}, werden im gleichen Leseraster translatiert. Sie unterscheiden sich jedoch durch das Fehlen einer aus 31 Aminosäuren (nt 976 bis nt 1069) bestehenden internen Region innerhalb des E1A_{12S}-Proteins (Abb. 2; Brockmann und Esche, 1995). Dieser Abschnitt umfasst die konservierte Region 3 und repräsentiert eine der drei E1A-Regionen (CR1, CR2, CR3), die zwischen den verschiedenen Adenovirus-Serotypen hoch konserviert sind (Kimelmann *et al.*, 1985). Neben dem nicht-konservierten Aminoterminal, beinhalten diese konservierten Regionen der E1A-Proteine die meisten transkriptionsregulierenden Funktionen, die für eine effiziente Virusreplikation und die zelluläre Transformation notwendig sind (Brockmann und Esche, 1995).

Im Fall der 11S-, 10S-, 9,5S- und 9S-mRNAs führen Spleißvorgänge zu einer Änderung des Leserahmens nach Aminosäure 29. Die translatierten Proteine enthalten demnach keine der konservierten Regionen und weisen, mit Ausnahme des N-terminalen Bereiches, keinerlei Sequenzhomologien zu den Proteinen E1A_{13S} und E1A_{12S} auf (Brockmann und Esche, 1995). Die funktionellen Aktivitäten dieser Proteine im lytischen Entwicklungszyklus sind bis heute noch weitgehend unbekannt.

1.4 Kontrolle der Genexpression durch E1A-Proteine

Als Transkriptionsfaktoren sind die E1A-Proteine für die Aktivierung der Expression aller anderen adenoviralen Gene von essentieller Bedeutung (Berk, 1986). Neben der Aktivierung der viralen Gene kann die Expression zellulärer Gene durch E1A-Proteine sowohl positiv (z. B. hsp70, PCNA, oder c-jun) als auch negativ (z. B. Insulin, Fibronectin, oder Kollagen) moduliert werden (Brockmann und Esche, 1995). Die E1A-Proteine besitzen keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985). Die genregulatorischen Funktionen werden über Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen zellulären Faktoren vermittelt. Ein Teil der bis heute bekannten Faktoren sind in Abb. 3 dargestellt. Diese Faktoren können grob in vier Klassen unterteilt werden.

(1) Generelle Transkriptionsfaktoren

Durch eine direkte Interaktion mit generellen Transkriptionsfaktoren können die E1A-Proteine die virale Genexpression in der infizierten Zelle effizient regulieren. Hier wurden beispielsweise Interaktionen des E1A_{13S}-Proteins, über die Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne CR3, mit den Komponenten des TFIID-Komplexes, wie z. B.

TBP und TAFs, gezeigt (Brockmann und Esche, 1995). Zudem wurde gezeigt, dass das E1A_{12S}-Protein über den N-Terminus (As 1-29) mit der RAP30-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIIIF interagiert (Lipinski *et al.*, 1998). Solche Interaktionen tragen u. a. zur Stabilisierung von PIC (pre-initiation complex) an Zielpromotoren bei (Brockmann *et al.*, 2001).

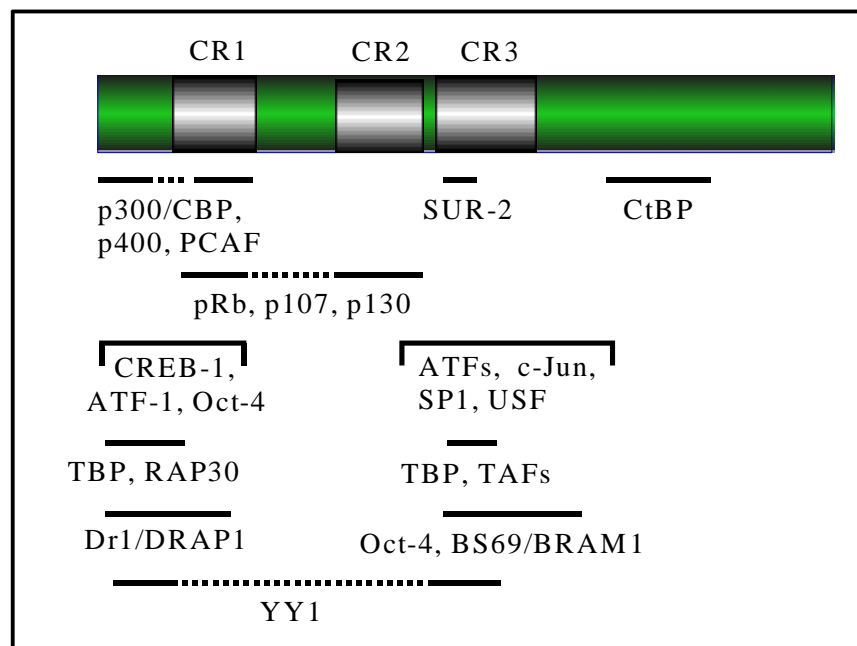


Abb. 3 Interaktion zellulärer Faktoren mit dem E1A-Protein. Das schematische Diagramm zeigt das E1A_{13S}-Protein. Die grauen Rechtecke stellen die konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) dar. Die bis heute bekannten Interaktionsbereiche für zelluläre Faktoren in E1A-Protein sind mit schwarzen Linien gekennzeichnet. Im Text erwähnte Faktoren: TBP (TATA-Box binding protein) und TAFs (TBP associated factors) sind Komponenten des basalen Transkriptionsfaktorkomplexes, ATFs, c-Jun, und CREB-1 sind sequenzspezifische DNA-Bindeproteine; p105RB, p107, und p130 gehören zur Familie der Pocketproteine; CtBP (carboxy-terminal binding protein) ist ein Korepressor; Dr1/Drp1 ist ein Repressor des TBP Proteins; p300/CBP, p400, und PCAF gehören zu den zellulären Koaktivatoren (nach Brockmann *et al.*, 2001).

(2) Sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren

Durch die Interaktion von E1A-Proteinen mit sequenzspezifisch an DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, werden die E1A-Proteine an die entsprechenden Zielpromotoren rekrutiert (Liu und Green, 1990). Diese Interaktion führt meist zur Aktivierung der Expression des Zielgens (Abb. 4A). Durch die Bindung der CR3-Domäne des E1A_{13S}-Proteins an die zellulären Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 kommt es z. B. zu der Aktivierung des c-jun-Promotors (Duyndam *et al.*, 1996). Auch die Interaktion des N-terminalen Bereiches des E1A_{12S}-Proteins mit den Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 ist im Prozess der Aktivierung z. B. des adenoviralen E2-Promotors von entscheidender Bedeutung (Fax *et al.*, 2000).

(3) *Repressorproteine*

Repressorproteine wie z. B. Dr1/DRAP1, p130, p107, und p105RB inhibieren die Aktivität von generellen bzw. sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren. Der Dr1/DRAP1-Komplex assoziiert mit dem TATA-Box bindenden Protein TBP und verhindert dessen Interaktion mit den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB (Mermelstein *et al.*, 1996). Die Dissoziation des Dr1/DRAP1-Komplexes, durch Interaktion mit den E1A-Proteinen, bewirkt die Freisetzung von TBP, welches dann die Transkription initiieren kann.

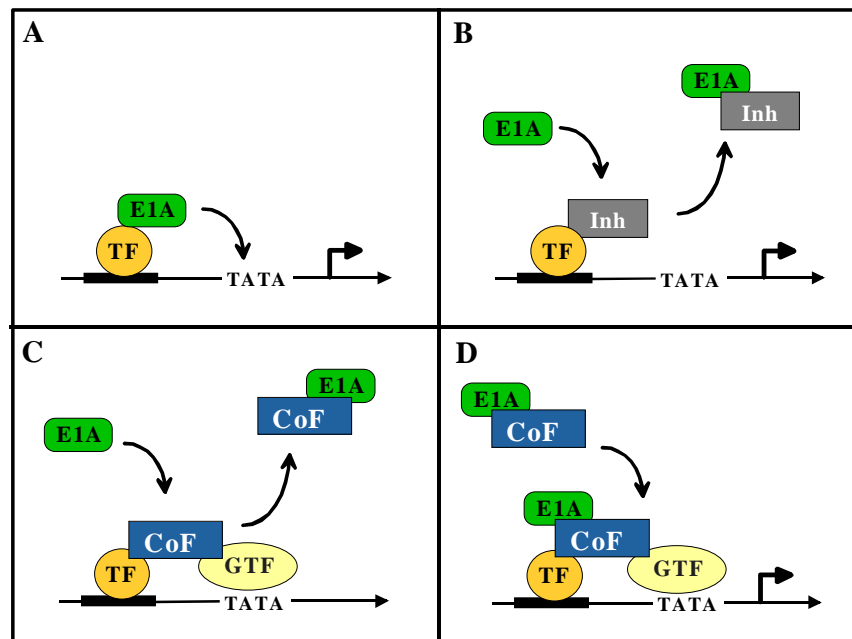


Abb. 4 Mechanismen der Transkriptionsregulation durch die E1A-Proteine. **A.** Regulation durch Rekrutierung der E1A-Proteine (E1A) im Aktivierungsprozess von Zielgenen durch DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren (TF) und anschließende Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (GTF). **B.** Dissoziation inhibitorisch wirkender Faktoren (Inh) aus Transkriptionsfaktorkomplexen und damit verbundene Aktivierung des Transkriptionsfaktors und der Expression des Zielgens. **C.** Dissoziation von Kofaktoren (CoF) aus transkriptionsaktiven Koaktivator/Transkriptionsfaktorkomplexen durch E1A-Proteine und damit Repression des Zielgens. **D.** Rekrutierung von Kofaktoren im Prozess der Transkriptionsaktivierung eines Zielgens durch E1A-Proteine.

Die sog. „Pocket-Proteine“ p130, p107, und p105RB assoziieren in der Zelle mit den Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktor-Familie (E2F-1-5). Diese E2F/Pocket-Protein-Komplexe sind transkriptionell inaktiv, oder als promotor-gebundene Komplexe sogar transkriptionell reprimierend (Weintraub *et al.*, 1992). Durch die CR1/CR2-abhängige Interaktion der E1A-Proteine mit den Pocket-Proteinen werden transkriptionsaktive E2F-Proteine, aus dem inhibitorischen Komplex mit p105RB,

freigesetzt (Ikeda und Nevins, 1993). Hierbei kommt es zur Aktivierung zahlreicher, für das Durchlaufen der S-Phase notwendiger Zielgene (Abb. 4B; Zhang und Dean, 2001).

(4) *Zelluläre Koaktivatoren*

Die zellulären Koaktivatoren, wie z. B. CBP/p300 und PCAF, stellen wichtige Bindeglieder zwischen sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und Faktoren des basalen Transkriptionsapparates dar (Janknecht und Hunter, 1996). Durch die Interaktion von E1A-Proteinen mit den Koaktivatoren kann die Transkription von Zielgenen sowohl positiv als auch negativ moduliert werden. Im Falle der transkriptionellen Repression führt die Interaktion des N-Terminus und der CR1-Domäne der E1A-Proteine mit CBP/p300 zu einer Dissoziation dieser Kofaktoren von promotor-assoziierten Transkriptionsfaktorkomplexen und damit zur Repression des Zielgens (Abb. 4C). Hierdurch wird beispielsweise die Transkription p53-abhängiger Zielgene unterdrückt (Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). Ein anderer Mechanismus der transkriptionellen Repression durch E1A-Proteine besteht in einer Konkurrenz mit dem CBP/p300-assoziierten Faktor PCAF um die Bindung an CBP/p300, welches die Transkription von PCAF-abhängigen Genen inhibiert (Puri *et al.*, 1998). Auch eine direkte Interaktion von E1A-Proteinen mit PCAF führt zur Inhibierung der Expression des betreffenden Zielgens (Reid *et al.*, 1998). Im Falle der transkriptionellen Aktivierung wird durch die E1A-Proteine die Rekrutierung der Kofaktoren, wie z. B. von CBP/p300 an den promotor-gebundenen Transkriptionsfaktorkomplexen, ermöglicht und dadurch die Transkription des Zielgens aktiviert (Abb. 4C). Dieses wurde z. B. bei der Aktivierung von E2F-abhängigen Promotoren gezeigt, wobei diese Aktivierung unabhängig von der Freisetzung des E2F-Proteins aus dem inhibitorischen E2F/p105RB-Proteinkomplex durch die E1A-Proteine erfolgt (Trouche und Kouzarides, 1996). Durch die Interaktion mit CBP/p300 sind die E1A-Proteine zudem in der Lage die Transkription von PKA/CREB-abhängigen Promotoren, wie etwa den humanen PCNA-Promotor (proliferating cell nuclear antigen; Lee and Mathews, 1997) oder den E2-Promotor des Adenovirus-Serotyp 12, zu aktivieren (s. Kapitel 1.8; Fax *et al.*, 2000).

Die Kofaktoren sind an der Kontrolle der Expression zahlreicher induzierbarer Gene beteiligt. Ihre Bedeutung bei der Regulation der Genexpression wurde durch Experimente veranschaulicht, in denen eine Veränderung der basalen Transkription erst unter der Mitwirkung dieser Kofaktoren zu erzielen war. Die Kenntnisse über ihre Funktion, als wichtige Bindeglieder zwischen sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und

Komponenten des basalen Transkriptionsapparates zu fungieren (Yuan *et al.*, 1996), wurde durch die Entdeckung einer Reihe enzymatischer Aktivitäten, die unter anderem Änderungen in der Chromatinstruktur bewirken, erweitert (Strahl und Allis, 2000). Diese Entdeckungen haben nicht nur die entscheidende Rolle der Kofaktoren als Chromatin-remodellierende Proteine, sondern auch die zentrale Stellung des Chromatins bei der Genregulation verdeutlicht. Da sowohl zelluläre als auch virale DNA im Zellkern als Chromatin organisiert vorliegen, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Gene und die Modulation der zellulären Regulationsabläufe von besonderer Bedeutung.

1.5 Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression

Im Zellkern eukaryontischer Zellen liegt die mit Histonproteinen assoziierte DNA in kompakter Form, die als Chromatin bezeichnet wird, vor. Die Grundverpackungseinheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Komplex aus DNA (ca.150 bp) gewunden um einen Kern aus Histonproteinen. Der nukleosomale Kern ist ein stabiles Octamer, bestehend aus zwei H2A und H2B Dimeren und einem H3/H4 Heterotetramer (Kornberg und Lorch, 1999). Die Nukleosomen sind in regelmäßigen Abständen auf der DNA angeordnet (Abb. 5). Die internukleosomalen DNA Bereiche sind mit H1-Histonen (Linker-Histon) assoziiert (Wolffe, 1995). Durch die Assoziation mit Linker-Histonen und einer Reihe von nicht-Histonproteinen, wie z. B. HMG-Proteine (high-mobility group), wird die nukleosomale Anordnung in einer weiteren kompakteren 30 nm Chromatinfibrille organisiert (Grunstein, 1998). Eine weitere, komplexere Organisationsform der DNA wird durch die Anordnung der Chromatinfibrille in schleifenförmigen Strukturen, welche über ein Proteingerüst (scaffold) mit der Kernmatrix verbunden sind, erreicht. Im Gegensatz zu den Nukleosomen ist der molekulare Aufbau und die Struktur der Chromatinfibrille und ihrer höheren Verpackungsordnungen bis heute nicht geklärt.

Studien über die Zugänglichkeit von Genen für die Transkriptionsmaschinerie haben gezeigt, dass Chromatin als hoch-organisierte, kompakte Form der DNA die Transkription inhibiert. Diese Repression wird sowohl durch die nukleosomale Anordnung, als auch durch die höhere Verpackungsordnung in der Chromatinfibrille vermittelt (Peterson, 2000). Durch die Interaktionen von Histonproteinen mit der DNA in den Nukleosomen werden regulatorisch wichtige DNA-Regionen im Promotor besetzt und für die sequenzspezifisch

DNA-bindenden Proteine unzugänglich gemacht. Auch die Nukleosom/Nukleosom Interaktionen in den Chromatinfibrillen wirken sich auf den Zugang von anderen im Transkriptionsprozess involvierten Proteinen limitierend aus. Die Überwindung dieser Barrieren wird durch die spezifische Rekrutierung von Chromatin-remodelierenden Faktoren, deren Aktivität eine Voraussetzung für die Interaktion regulatorischer Proteine bzw. Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie mit ihren Zielsequenzen auf der DNA ist, ermöglicht (Kingston und Narlikar, 1999).

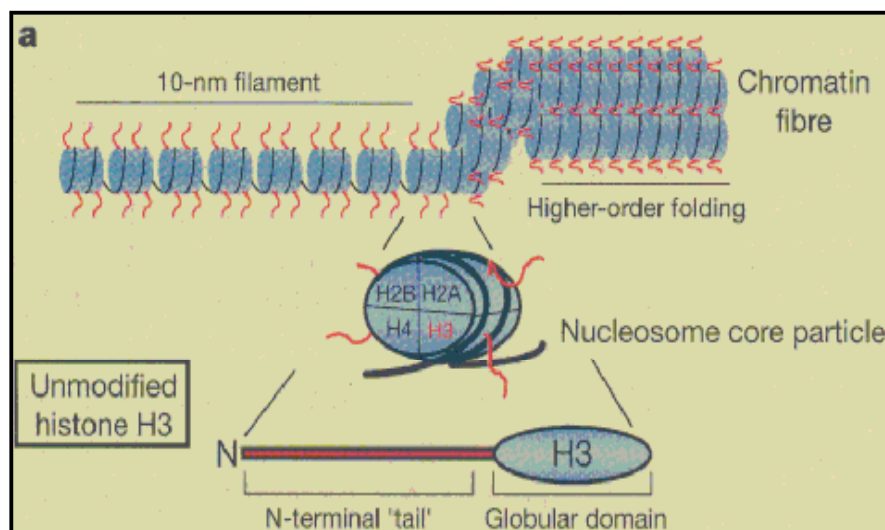


Abb. 5 Schematische Darstellung der Organisation des Chromatins (nach Strahl und Allis, 2000). Die DNA-Doppelhelix (schwarze Linie) ist um ein Histonoktamer (je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4, blau dargestellt) gewunden. Die N-terminalen Enden von Histonproteinen (rot dargestellt) sind Orte der post-translationalen Modifikationen. Die H1-Histone (nicht dargestellt) sind mit internukleosomalen DNA Bereichen assoziiert und für die Organisation der nukleosomalen Anordnung in 30 nm Chromatinfibrille mitverantwortlich.

Die bis heute bekannten Chromatin-remodellierenden Faktoren können in zwei Klassen unterteilt werden (Berger, 2002; Narlikar *et al.*, 2002). Zu der ersten Klasse zählen die Faktoren, welche unter dem Verbrauch von Energie, die Änderungen der Chromatinstruktur bewirken. In der zweiten Klasse werden die Faktoren zusammengefasst, die durch kovalente Modifikationen an den N-terminalen Enden der Histon-Proteine, wie z. B. Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung, Änderung in der Chromatinstruktur bewirken. Von den genannten kovalenten Modifikationen stellt die Histonacetylierung den am besten erforschten und am häufigsten mit der Genaktivierung in Verbindung gebrachten Mechanismus dar.

1.6 Histonacetylierung

Die Histonproteine sind in Eukaryonten hoch konserviert. Es handelt sich hierbei um kleine basische Proteine (11 bis 21 kDa), wobei die Aminosäuren Arginin und Lysin ca. 25% der Proteinmasse ausmachen. Die globulären C-terminalen Enden der Proteine enthalten das Histon-Motiv, welches in den nukleosomen Partikeln für die Wechselwirkung der Histone untereinander bzw. mit der DNA verantwortlich ist (Abb. 5). Die Lysine und Arginine sind in den, aus den nukleosomen Partikeln herausragenden, N-terminalen Enden der Histone („histon tails“) lokalisiert (Arents *et al.*, 1991). Die N-terminalen Enden der Histone sind, durch die Interaktion mit der von der Histon-Oberfläche abgewandten Seite der DNA, sowohl an dem Aufbau der Nukleosome als auch, durch die internukleosomalen Kontakte mit anderen Histonen sowie nicht-Histonproteinen, an der Organisation des Chromatins in 30 nm Fibrillen beteiligt (Allan *et al.*, 1982).

Die N-terminalen Bereiche sind Orte der post-translationalen Modifikationen. Eine Korrelation zwischen den Histon-Modifikationen und Genaktivierungen wurde zuerst nach der Entdeckung von acetylierten Histonen, der ersten *in vivo* beobachteten Histon-Modifikation, vermutet (Allfrey *et al.*, 1964). Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung von hyperacetylierten Histonen im transkriptionell aktiven Euchromatin und der Hypoacetylierung der Histone im transkriptionell inaktiven Heterochromatin bestätigt (Pazin und Kadonaga, 1997).

Die Proteine mit Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität werden aufgrund ihrer zellulären Lokalisation in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen in die im Cytoplasma lokalisierten B-HATs, die für den Kerntransport von Histonproteinen verantwortlich sind, zum anderen in die im Transkriptionsprozess involvierten nukleären A-HATs (Brownell und Allis, 1996). Die erste charakterisierte katalytische Untereinheit der A-HATs ist p55 aus *Tetrahymena thermophila* (Brownell und Allis, 1995). Dieses Enzym ist das Homolog zum *S. cerevisiae* GCN5-Protein (Brownell *et al.*, 1996), welches als Koaktivator für die Expression einer Vielzahl von Hefe-Genen verantwortlich ist (Berger *et al.*, 1992).

In Säugerzellen sind u. a. CBP/p300, PCAF, hGCN5 und SRC1 als nukleäre Proteine mit intrinsischer HAT-Aktivität identifiziert (Cheung *et al.*, 2000). Die HAT-Aktivität dieser Koaktivatoren ist für die Funktion zahlreicher sequenzspezifisch-bindender Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CREB und den nukleären Hormon-Rezeptoren, von entscheidender Bedeutung. In humanen Zellen kommen PCAF und hGCN5 in verschiedenen γ SAGA-ähnlichen Komplexen vor. Im Gegensatz zu CBP/p300, die zur Acetylierung von allen vier nukleosomalen Histonproteinen in der Lage sind (McKenna *et al.*, 1999), können

PCAF und hGCN5 nur die Histone H3 und H4 acetylieren (Ogryzko *et al.*, 1998). Einige dieser Koaktivatoren, wie z. B. PCAF und SRC1, können in der Zelle mit CBP/p300 assoziiert vorliegen (Torchia *et al.*, 1998). Häufig ist nur die HAT-Aktivität einer dieser Koaktivatoren für die Funktion spezifischer Aktivatoren erforderlich. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass für die Aktivität CREB-abhängiger Gene die HAT-Aktivität von CBP/p300 benötigt wird, für die Funktion der Aktivatoren MyoD und RAR (retinoic acid receptor) ist aber die HAT-Aktivität der PCAF von Bedeutung (Korzus *et al.*, 1998). Neben der Histonacetylierung sind diese Koaktivatoren auch zur Acetylierung einer Vielzahl von nicht-Histonproteinen, wie u. a. architektonisch DNA-bindenden Faktoren (z. B. HMGs), basalen Transkriptionsfaktoren (z. B. TFIIE) und sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren (z. B. p53, EKLF, MyoD und E2F) in der Lage (Bannister und Miska, 2000).

Der Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung und der Genaktivierung wird durch mehrere Mechanismen erklärt. Die Histonacetylierung erfolgt durch die Übertragung einer Acetyl-Gruppe vom Acetyl-Coenzym A zu den bestimmten ϵ -N-Lysinresten in den aminoterminalen Enden der Histonproteine. Dieser Vorgang neutralisiert zum einen die positiv geladenen Aminosäuren in den N-terminalen Enden der Histone, welche zu einer Herabsetzung ihrer Affinität zu DNA führt. Die daraus resultierende lokale Destabilisierung der DNA/Histon-Interaktion in den nukleosomalen Partikeln kann die Bindung von sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren an die nukleosomale DNA erleichtern (Grunstein, 1997). Zum anderen können die acetylierten Histone als spezifische Bindestellen für die Rekrutierung anderer regulatorischer Proteine dienen (Davie und Spencer, 1999). Die Acetylierungen der N-terminalen Enden der Histonproteine können auch zur Destabilisierung von Nukleosom/Nukleosom-Interaktionen in den Chromatinfibrillen beitragen. Diese Destabilisierungen führen zur Öffnung der Chromatinstruktur, welche den Zugang von generellen Transkriptionsfaktoren an die Promotor-Region erleichtern (Sternier und Berger, 2000). Die daraus resultierenden reversiblen und lokalen Änderungen in der Chromatinstruktur können dann durch die spezifische Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs), die an der Repression der Transkription beteiligt sind, wieder rückgängig gemacht werden (Urnov und Wolffe, 2001).

1.7 Energie-abhängige Änderungen der Chromatinstruktur

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Proteinkomplexen, welche die chemische Energie der ATP-Hydrolyse zur Änderung der Chromatinstruktur verwerten, identifiziert. Wie die Histonproteine und die Komponenten des basalen Transkriptionsapparates sind die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe in allen eukaryontischen Zellen hoch konserviert (Fyodorov und Kadonaga, 2001). Einige diese Komplexe sind bisher in *S. cerevisiae* (ySWI/SNF, yRSC, yISWI1 und yISWI2), *D. melanogaster* (dACF, dNURF, dCHAC und dBRM), *X. leavis* (xMi-2 und xACF) und humanen Zellen (hSWI/SNF, hNURD und hRSF) identifiziert worden. Sie spielen bei der Initiation und der Regulation zellulärer Prozesse, in denen Interaktionen mit der DNA erforderlich sind (z. B. Replikation, Rekombination, DNA-Reparatur und Transkription) eine wesentliche Rolle (Becker und Hörz, 2002).

Alle diese Komplexe beinhalten eine Untereinheit, welche für die ATP-abhängigen Änderungen in der Chromatinstruktur verantwortlich ist. Diese Untereinheiten werden in der SWI2/SNF2 Familie der DNA-stimulierten ATPasen zusammengefasst. SWI2/SNF2 ist die erste ATPase-Untereinheit, die im ySWI/SNF-Komplex identifiziert wurde. Aufgrund der Homologie ihrer ATPase-Untereinheit, außerhalb der ATPase-Domäne, werden die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe in drei Gruppen aufgeteilt: SWI/SNF-, ISWI- und die Mi-2-Gruppe (Muchardt und Yaniv, 1999). Im Gegensatz zur der ISWI- und Mi-2-Gruppe, deren Mitgliedern hauptsächlich in die Repression der Transkription involviert sind (Wade *et al.*, 1999), spielen die Mitglieder der SWI/SNF-Gruppe bei der Aktivierung der Genexpression eine große Rolle. Ihre Funktion bei der Transkriptionsregulation trägt zur Kontrolle von zellulären Vorgängen, wie z. B. Proliferation, Differenzierung und Entwicklung, bei (Klochendler-Yeivin und Yaniv, 2001).

Der Prototyp dieser Komplexe ist der *S. cerevisiae* SWI/SNF-Komplex (ySWI/SNF). Durch Mutationen in den *swi*- und *snf*-Genen (switching/sucrose non-fermenter) wurde dieser Komplex zunächst als positiver Regulator, der für die Transkription zahlreicher unterschiedlich induzierbarer Gene verantwortlich ist, identifiziert. Der Zusammenhang zwischen der Funktion von ySWI/SNF-Komplexen und der chromosomalen Struktur wurde deutlich als gezeigt wurde, dass Mutationen in DNA-assoziierten Proteinen, wie z. B. Histonproteinen, die *swi*⁻/*snf*⁻ Phänotypen aufheben können (Kruger *et al.*, 1995). Interessanterweise führten die Mutationen in *swi*/*snf* zu einer erhöhten Expression einiger anderer Gene, welches auf eine Beteiligung der SWI/SNF-Komplexen sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Repression der Transkription hinweist (Holstege *et al.*, 1998).

In humanen Zellen sind bisher zwei ySWI2/SNF2-ähnliche Proteine, BRM (Brahma) und BRG1 (Brahma-related gene 1), identifiziert worden (Khavari *et al.*, 1993). Diese ATPase-Untereinheiten kommen in unterschiedlichen Komplexen vor und sind in der Zelle mit einer Reihe anderer Proteine, BAFs (BRG1 oder BRM associated factors), assoziiert. Obwohl die verschiedenen hSWI/SNF-Komplexe die meisten dieser Untereinheiten teilen, ist die Komposition dieser Untereinheiten nach Komplex, Zelltyp oder Gewebe unterschiedlich. Je nach dem Vorkommen einiger Untereinheiten und der ATPase-Untereinheit kann bei den hSWI/SNF-Komplexen zwischen der BAF (hSWI/SNF-A; mit BAF250/270 und BRG1 oder BRM), der PBAF (hSWI/SNF-B; mit Polybromo/BAF180 und BRG1), hBRG1 (I)- und hBRM-Komplex (mit BAF60 und p220) oder hBRG1 (II)-Komplex unterschieden werden (Martens und Winston, 2003). Wie auch die ySWI/SNF-Komplexe sind die humanen Komplexe große Multimere von ca. 11 Untereinheiten und ~2MDa Masse (Wang *et al.*, 1996). Der minimal-katalytische Core dieser Komplexe besteht aus einer der ATPase-Untereinheiten und drei anderen Proteinen: BAF47 (Ini1), BAF53b und BAF155/BAF170, welche auch für den Zusammenbau der Komplexe, der Interaktionen mit der DNA sowie für die Verbindung mit der Kernmatrix verantwortlich sind (Muchardt und Yaniv, 1999). Obwohl Komponenten des minimal-katalytischen Core-Komplexes die hohe Effizienz der Chromatin-remodellierenden Aktivität des Komplexes bewirken, sind BRG1 und hBRM allein in der Lage dieser Funktion auszuüben (Phelan *et al.*, 2000). *In vitro* Studien zeigen, dass die übrigen hSWI/SNF Untereinheiten nicht zu der Chromatin-remodellierenden Aktivität des Komplexes beitragen.

Die hSWI/SNF-Komplexe sind an der Regulation des Zellzyklus durch Interaktion mit einer Reihe regulatorischer Proteine u. a. p105RB, p53, cyclin E, BRCA1 und β -Catenin beteiligt. Zahlreiche humane Tumorzelllinien weisen Mutationen in einer der Untereinheiten dieser Komplexe auf. Weiterhin zeigen Tierversuche, dass Mäuse, die heterozygot für *mbrg1* oder *mbaf47* sind, hohe Neigung zur Entwicklung verschiedener Tumorarten besitzen. Diese Prädisposition konnte bei den heterozygoten Mäusen für *mbrm* nicht beobachtet werden (DeCristofaro *et al.*, 2001; Reisman *et al.*, 2003).

Die hBRG1 und hBRM Proteine weisen zu 75% identische Proteinsequenzen auf. Die Annahme, dass diese Proteine aufgrund der hohen strukturellen Homologie gleiche biologische Funktionen ausüben, konnte durch Untersuchungen an null-allelen (knock-out) Mäusen nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu *mbrm*^{-/-} Mäusen, welche lebensfähig und fertil sind, wirkt sich die *mbrg1*^{-/-}-Mutationen in sehr frühen Entwicklungsphasen der Maus-Embryogenese (noch vor der Implantation) letal aus (Bultman *et al.*, 2000).

Studien zur Aufklärung der Rolle von den hSWI/SNF-Komplexen bei der Transkription haben gezeigt, dass die ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Aktivität dieser Komplexe entscheidend zur Initiation der Transkription spezifischer Gene beiträgt (Côté *et al.*, 1994). Die Aktivität ihrer ATPase-Untereinheiten ist für die Funktion einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie z. B. nukleären Rezeptoren (GR, ER und RAR; DiRenzo *et al.*, 2000), C/EBP β (Kowenz-Leutz und Leutz, 1999), c-Myc (Cheng *et al.*, 1999), Hsp70 (de La Serna *et al.*, 2000) und MyoD (de La Serna *et al.*, 2001) erforderlich. Einige dieser Studien belegen, dass die ATPase-Untereinheit durch die Interaktion mit DNA-sequenzspezifisch-bindenden Aktivatoren an den Promotor rekrutiert wird. Es wird vermutet, dass bei Genaktivierungen die ATP-abhängigen Änderungen in der Chromatinstruktur eine erhöhte DNA-Zugänglichkeit bewirken, welche die Interaktion von Aktivatoren bzw. anderen an der Transkription beteiligten Proteinen mit der DNA erleichtert.

Die Mechanismen der ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierung sind bisher nicht geklärt. Eine Reihe von *in vitro* Studien lassen jedoch vermuten, dass die SWI/SNF-Komplexe die Energie von ATP-Hydrolyse zur Destabilisierung von DNA/Histon Interaktionen verwenden. Hierbei wurde sowohl die Verschiebung von Histon-Octameren entlang der DNA (*cis*-movement; Whitehouse *et al.*, 1999), als auch der Transport von Histonen von einer Donor- zur Akzeptor-DNA (*trans*-movement; Lorch *et al.*, 1999) beobachtet. Die Komplexe sind außerdem in der Lage Änderungen in der DNA-Struktur (Liu *et al.*, 2001), oder der Topologie der DNA (Havas *et al.*, 2000) zu bewirken. Durch solche lokalen und transienten Änderungen werden regulatorisch wichtige DNA-Abschnitte für die Interaktion mit regulatorischen Proteinen zugänglich gemacht. Da die Funktion der ySWI/SNF-Komplexe auch bei der Aktivierung einer Vielzahl von Hefe-Genen in der späten Mitose (G₂/M) von entscheidender Bedeutung ist, wird vermutet, dass die SWI/SNF-Komplexe *in vivo* auch an der Reorganisation von höheren Verpackungsordnungen des Chromatins beteiligt sind (Krebs *et al.*, 2000).

1.8 Interaktion der E1A-Proteine mit den Chromatin-remodellierenden Faktoren

Die Chromatin-remodellierenden Faktoren stellen wichtige zelluläre Interaktionspartner der E1A-Proteine zur Modulation der Genexpression dar. Die Aktivität dieser Faktoren kann durch die E1A-Proteine sowohl direkt, als auch indirekt beeinflusst werden. Hierbei wurde gezeigt, dass die E1A-Proteine bei der Interaktion von p105RB mit Chromatin-remodellierenden Faktoren, wie z. B. Histon-Deacetylasen (HDACs) und hSWI/SNF-Komplexe, interferieren. Die E1A-Proteine sind dadurch in der Lage die Expression von den an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten Genen zu modulieren und den p105RB-induzierten Zellzyklusarrest aufzuheben (Strober *et al.*, 1996).

Weiterhin sind die E1A-Proteine in der Lage die Histon-Deacetylasen, durch die Konkurrenz um die Bindung an CtBP (carboxy-terminal binding protein), zu inaktivieren und damit die Transkription der Zielgene zu aktivieren (Schaeper *et al.*, 1995). Auch die Interaktion von E1A-Proteinen mit p400, einem Mitglied der SWI2/SNF2-Familie, ist für die E1A-vermittelte Transformation von entscheidender Bedeutung (Fuchs *et al.*, 2001).

Eine direkte Interaktion mit zellulären Histonacetyltransferasen (HATs), wie z. B. CBP/p300 ermöglicht zudem den E1A-Proteinen die Transkription einiger zellulärer bzw. viraler Promotoren zu aktivieren. Ein hervorragendes Beispiel hierfür ist der E2-Promotor des Adenovirus-Serotyp 12 (Fax *et al.*, 2000). Für die Aktivierung des PKA/CREB-abhängigen E2-Promotors ist die HAT-Aktivität von CBP/p300 von entscheidender Bedeutung. CBP/p300 wird durch die Interaktion mit dem E1A_{12S}-Protein und den zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1, welche mit dem E2-CRE (cAMP-response element) assoziiert vorliegen, an den E2-Promotor rekrutiert. Hierbei wird die HAT-Aktivität von CBP/p300 durch das E1A_{12S}-Protein aktiviert.

Immer noch ungeklärt ist jedoch die Frage ob die E1A-Proteine mit den ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Faktoren interagieren.

1.9 Zielsetzung

Da die virale DNA nach dem Eintritt in den Zellkern in Chromatin-ähnlichen Strukturen verpackt wird, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Gene von besonderer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Interaktion von ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen mit dem E1A_{12S}-Onkoprotein des Adenovirus Serotyp 12. Es sollte geklärt werden, ob die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe an der E1A_{12S}-vermittelten Regulation der Genexpression beteiligt sind. Da sich humane SWI/SNF-Komplexe in ihren ATPase-Untereinheiten unterscheiden, war es von besonderer Bedeutung zu analysieren, ob bei der E1A-regulierten Genexpression eine Spezifität bezüglich dieser Komplexe vorliegt.

Im Falle einer Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der E1A-vermittelten Genregulation sollte insbesondere analysiert werden, ob die hSWI/SNF-Komplexe mit dem adenoviralen Protein direkt interagieren. Nachfolgend sollte untersucht werden an welcher Untereinheit das adenovirale Protein bindet. Zudem sollten die für die Bindung verantwortlichen Proteindomänen identifiziert werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie die transkriptionsregulierende Funktion dieser Komplexe durch das E1A_{12S}-Protein an den Promotor rekrutiert wird. Als Modellsystem für die Untersuchungen wurde der E2-Promotor des Adenovirus Serotyp 12, der für Replikationsrelevante Proteine kodiert und dessen Aktivierung durch das E1A_{12S}-Protein reguliert wird, verwendet (s. Kap. 4.1).

Der E2-Promotor wird über ein Konsensus-CRE-Promotorelement reguliert und kann durch die katalytische Untereinheit des PKA-Holoenzym aktiviert werden (Fax *et al.*, 2000). Es sollte daher anhand des E2-Modellpromotors, unabhängig von dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein, untersucht werden, ob die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe an der Regulation der Expression von Genen, die durch cAMP/PKA-Signalweg aktiviert werden, beteiligt sind.

2. Material

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“), sowie nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf, wurden in der erforderlichen Qualität im Fachhandel bezogen.

2.1 Chemikalien

Acetyl-CoA (Coenzym A)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Acrylamid	BioRad, München
Agarose	FMC Bioproducts, Dänemark, über Biozym, Hameln
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bacto yeast extract	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Peptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma, Deisenhofen
Deoxycholat (als Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethylacetat	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Glycogen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

HEPES	Sigma, Deisenhofen
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München
Natriumbutyrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Fluka, Neu-Ulm
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	BioRad, München
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Diverse Restriktionsenzyme (2-50 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Life Technologies, Eggenstein Promega, Heidelberg
Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (2 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym (23000 U/mg)	Biomol, Hamburg
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	Life Technologies, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteinase K (20 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Antikörper

Anti-Ad12 E1A-Antiserum (polyklonales Schaf Antiserum)	Zur Verfügung gestellt von Phil Gallimore, University of Birmingham, England
Anti-hBRG1-Antiserum (polyklonales Kaninchen Antiserum)	Zur Verfügung gestellt von R. E. Kingston, Harvard Medical School, Boston, USA
Anti-hBRG1-AK (N-19) (polyklonaler Ziege AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-hBRM-AK (N-19) (polyklonaler Ziege AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-BAF47-AK (C-18) (polyklonaler Kaninchen AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-BAF57-AK (polyklonaler Kaninchen AK)	Biomol, Hamburg
Anti-BAF155-AK (H-76) (polyklonaler Kaninchen AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-Kaninchen IgG AK Peroxidase-konjugiert	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Maus IgG AK Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-Ziege IgG AK Peroxidase-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-myc-Epitop (9E10) AK (monoklonaler Maus IgG AK)	Invitrogen, Niederlande
Anti-PKA α cat (c-20) (polyklonaler Kaninchen IgG-AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-Schaf IgG AK Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
Normales Kaninchen IgG Antiserum	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

2.4 Nukleinsäuren

Heringssperma-DNA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
-------------------	--

2.5 Oligonukleotide

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Die Oligonukleotide wurden in H₂O aufgenommen (Endkonzentration der Stammlösung je 100 pmol/μl). Modifikationen oder zusätzlich synthetisierte Nukleotide (z. B. Restriktionsschnittstellen) in den aufgeführten Oligonukleotiden sind in Klammern gesetzt.

Name	Sequenz
5'-hBRG1-Wt	5'-(ATATAATATTA)TCCACTCCAGACCCACCCCTG-3'
3'-hBRG1-Wt	5'-(ATATAATATTA)GTCTTCTTCGCTGCCACTTCC-3'
5'-hBRG1-PR	5'-(CGGAATTC)ATGTCCACTCCAGACCCACCCCTG-3'
3'-hBRG1-PR	5'-(CGAAGCTT)GCTCTGCTTCTGGTGCAGTGGCAC-3'
5'-hBRG1-HC	5'-(CGGGATCC)ATGCGCATCACCCCCATCCAGAAG-3'
3'-hBRG1-HC	5'-(CGAAGCTT)CTGCAGGCCACGTGCAAGGGCCTG-3'
5'-hBRG1-ATPase	5'-(CGGATATC)ATGTCCTACTATGCCGTGGCCCAT-3'
3'-hBRG1-ATPase	5'-(CGGGTACC)CTGACGTCCACTGCTGCTGTCCTT-3'
5'-hBRG1-BD	5'-(CGGAATTC)ATGCTCAGCGAGGTCTTCATCCAG-3'
3'-hBRG1-BD	5'-(CGGGATCC)GTCTTCTTCGCTGCCACTTCCTGA-3'
3'-pcDNA3.1	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
5'-pGEX	5'-AGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGT-3'
5'-E2 _{Ad12} /CHIP	5'-AGGCGTGGGAATATCTTTACT-3'
3'-E2 _{Ad12} /CHIP	5'-GTTCTTTACGATGCCATTGGG-3'

2.6 Molekulargewichtstandards

100-bp DNA-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
[¹⁴ C]-markierter SDS-PAGE Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.7 Verwendete Vektoren

2.7.1 Reporterplasmide

pBL-CAT3	Basaler CAT-Reportergen-Vektor, Luckow und Schütz (1987)
G5-E1BTATA-CAT	Zur Verfügung gestellt von R. Bernards, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande

2.7.2 Expressionsplasmide

pBJ5-hBRG1	Zur Verfügung gestellt von C. Muchardt, Unité des Virus Oncogènes, Dpt. Des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
pCG-hBRM	Zur Verfügung gestellt von C. Muchardt, Unité des Virus Oncogènes, Dpt. Des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
RSV-CHO-PKAc α	Zur Verfügung gestellt von R. A. Maurer, Dpt. of Cell and Developmental Biology, Oregon Health Sciences University, Portland, USA
pCMV-HA-HDAC1	Zur Verfügung gestellt von A. Harel-Bellan, Laboratoire Oncogénèse, Différenciation et Transduction du Signal, Villejuif, Frankreich
pRc/RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Niederlande
pCR3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Niederlande
pcDNA3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor mit Myc/His- Epitop, Invitrogen, Niederlande
pGEX-2T	Bakterieller Expressionsvektor mit GST- Proteindomäne, Pharmacia Biotech, Freiburg

2.8 Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen, -schalen	Becton Dickinson, New York, USA, über Oehmen, Essen
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Eggenstein PAA, Marburg
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G (1000 U/ml)	Hoechst, Frankfurt
RPMI1640	Life Technologies, Eggenstein
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

2.9 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Dünnschichtchromatographie-Platten, Kieselgel, 0,2 mm Schichtdicke	Riedel-deHaen, Seelze
Elektroporationsküvetten, 0,4 mm	BioRad, München
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A/G Sepharose	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Rotiszint eco plus Szintillationsflüssigkeit	Roth GmbH, Karlsruhe
Sterivex-GS 0,22 µm Filter Unit	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

2.10 Spezielle Laborgeräte

Automatic TLC-Linear Analyzer	Berthold, Overrath
DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Gene Pulser Elektroporator	BioRad, München
Laser Densitometer Ultrascan XL	Pharmacia Biotech, Freiburg
Szintillationsmessgerät Delta 300, Searle Analytic Incorporation	über Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA

2.11 Kits und spezielle Reagenzien

Aprotinin (Rinderlunge, 4 TIU/mg)	Sigma, Deisenhofen
BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Eukaryotic TA Expression Kit	Invitrogen, Niederlande
Lipofectamine	Life Technologies, Eggenstein
Metafectene	Biontex, Martinsried
OPTI-MEM	Life Technologies, Eggenstein
Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
Roscovitine	Calbiochem, Heidelberg
Superfect	Qiagen, Hilden
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz- Detektionssysteme (für Western-Blot)	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
TNT-Kit, Quick Coupled Transcription/Translation Systems	Promega, Heidelberg

2.12 Radiochemikalien

[³⁵ S]-Methionin >37 TBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
D-Threo-[dichloracetyl-1- ¹⁴ C]- Chloramphenicol ~3,7 GBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege

2.13 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit H ₂ O ad 100 ml
Ampicillinlösung	50 mg/ml in H ₂ O
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O
CHIP-Lyse-Puffer	50 mM HEPES/KOH, pH 7,5 150 mM KCl 1 mM EDTA 0,5% NP-40 0,1% Natriumdeoxycholat
CHIP-Wasch-Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% Triton-X-100 0,1% Natriumdeoxycholat
CHIP-Wasch-Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 1% Triton-X-100 0,1% Natriumdeoxycholat

CHIP-Wasch-Puffer C	10 mM Tris/HCl, pH 8,1 250 mM LiCl 1 mM EDTA 1% NP-40 1% Natriumdeoxycholat
DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenxanol FF 30% (v/v) Glycerin
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in A. bidest
Elektroporation-Puffer	RPMI1640 10 mM Glucose 0,1 mM DTT 1,25% (v/v) DMSO
Gelfärbelösung (SDS-PAGE)	450 ml H ₂ O 450 ml Methanol 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
Gelfixierlösung (SDS-PAGE)	50% (v/v) 2-Propanol 7% (v/v) Essigsäure
IP+150-Puffer	50 mM HEPES/KOH pH 7,5 150 mM KCl 1 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 0,1% (v/v) NP-40 0,5 mM Pefabloc 10 µg/ml Aprotinin
IPTG-Lösung	1 M in H ₂ O (bei –20 °C gelagert)
Kernextrakt-Puffer A	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,5 mM Pefabloc

Kernextrakt-Puffer C	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 420 mM NaCl 1 mM DTT 0,2 mM EDTA 25% Glycerin 10 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄ 0,5 mM Pefabloc
Kernextrakt-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 0,25 M Sucrose 0,5 mM DTT 0,5 mM Pefabloc
Lysepuffer	250 mM KCl 50 mM HEPES/KOH, pH 7,9 0,1% NP-40 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM Pefabloc 10 µg/ml Aprotinin
NETN-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM KCl 1 mM EDTA 0,5% NP-40
PBS	4 mM MgSO ₄ 7 mM CaCl ₂ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄
PBS ⁼	wie PBS, ohne MgSO ₄ und CaCl ₂

PC+150-Puffer	20 mM HEPES/KOH pH 7,9 150 mM KCl 12,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 0,05% (v/v) NP-40 0,05% (v/v) Tween 20 0,5 mM Pefabloc 2 µg/µl BSA
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO ₃ mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,6% (w/v) Bromphenolblau
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer (für Western-Blot)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% (w/v) SDS für Proteine < 180 kDa oder 0,8% (w/v) SDS für Proteine > 180 kDa 20% (v/v) Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/l Trypsin in PBS ⁻

2.14 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide (Life Technologies, Eggenstein).

E. coli K12 BL21 [F⁻, *ompT*, *hsdS* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*] ist ein Protease-defizienter Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen (Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.15 Zelllinien

C33A-Zellen	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
HEK12-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch Transfektion des <i>EcoR</i> IC-Fragments von Ad12 (Whittaker <i>et al.</i> , 1984); zur Verfügung gestellt von P. Gallimore, University of Birmingham, UK
KB-Zellen	Humane epidermale Rachen-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
Saos2-Zellen	Humane Osteo-Sarkomazelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
SW13-Zellen	Humane epitheloide Rachen-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)

3. Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Die Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Lösungen und Materialien wurden bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert. Alle Arbeiten mit Bakterien, Nukleinsäuren und Proteinen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, unter Eiskühlung der Proben durchgeführt.

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden gemäß den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.* 1997) durchgeführt.

3.2 Zellkultur

Die adhärenenten Zelllinien KB, HEK12, SW13 und C33A wurden in beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37°C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM (s. Kap. 2.8), versetzt mit 10% FKS, 1,5% nicht essentiellen Aminosäuren, 1,5% einer 2 mM L-Glutaminlösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (im Folgenden als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Für alle routinemäßigen Zellkulturarbeiten wurden die verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt. Konfluent gewachsene Zellen (80-90%) wurden mit PBS⁼ (s. Kap. 2.13) gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der beschichteten Fläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 in neue Zellkulturgefäße überführt.

Zur Lagerung von Zellstocks wurden die Zellen (50% Konfluenz) wie oben beschrieben behandelt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend abzentrifugiert (600 x g, 1 min, RT) und in Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspensionen (5 x 10⁶ Zellen/ml) wurden in mit Zellstoff isolierten Kryogeßäßen bei -80°C schonend eingefroren und nach 12-24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mittels liposomaler Transfektionsreagenzien (Lipofektion; s. Kap. 3.3.1) oder durch Elektroporation (s. Kap. 3.3.2).

3.3.1 Lipofektion

Die Transfektion von Eukaryontenzellen erfolgte unter Verwendung der liposomalen Transfektionsreagenzien Lipofectamine oder Superfect (s. Kap. 2.11) gemäß den Angaben der Hersteller. 18-24 h vor Transfektionsbeginn wurden $1,5$ bis $2,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (7 cm^2 Wachstumsfläche) in Abhängigkeit von dem verwendeten Transfektionsreagenz in DMEM-Vollmedium bzw. DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika ausgesät. Die Zellen wurden 5 bis 6 h mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und den DNA-Lipidkomplexen, inkubiert. Durch Austausch des Transfektionsansatzes mit DMEM-Vollmedium wurde die Transfektion anschließend gestoppt. Die Zellen wurden nach 24 bis 48 h geerntet.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen in Extrakten aus Kulturzellen wurden 8×10^8 Zellen (aufgeteilt auf vier Löcher einer 6-Loch-Zellkulturplatte) mit $10 \mu\text{l}$ Metafectene und $1,5 \mu\text{g}$ DNA pro Loch transfiziert. 24 h nach dem Transfektionsbeginn wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS^- gewaschen und von der Oberfläche der Zellkulturplatte mittels VT-Lösung abgelöst. Die abgelösten Zellen von vier Löchern wurden in DMEM-Vollmedium aufgenommen und abzentrifugiert ($78 \times g$, RT, 2 min). Das Zellpellet wurde in DMEM-Vollmedium resuspendiert, die Zellen auf eine 78 cm^2 -Zellkulturschale ausgesät und für weitere 24 h inkubiert.

3.3.2 Elektroporation

Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von Melkonyan *et al.* (1996) elektroporiert. Hierzu wurden $9,2 \times 10^6$ Zellen mit $15 \mu\text{g}$ der zu transfizierenden DNA in $400 \mu\text{l}$ Elektroporationspuffer (s. Kap. 2.13) vermischt, blasenfrei in Elektroporationsküvetten überführt und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 250 V und $960 \mu\text{F}$ für 2 s elektroporiert (s. Kap. 2.10). Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei RT wurden die transfizierten Zellen in DMEM-

Vollmedium, das zusätzlich 1,25% DMSO enthielt, auf 78 cm²-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen auf neue 78 cm²-Zellkulturschalen passagiert und für weitere 24 h in DMEM-Vollmedium kultiviert.

3.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im quantitativen Maßstab erfolgte mit dem „Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500“ gemäß den Angaben der Firma Macherey & Nagel (s. Kap. 2.11). Die Plasmid-DNA-Maxipräparation beruht hierbei auf einer optimierten Form der alkalischen Lyse-Methode nach Birnboim und Doly (1979).

3.5 Aufreinigung und Klonierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter oder restringierter DNA, sowie die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction“-Kits der Firma Qiagen (s. Kap. 2.11). Die Sequenzierung aller innerhalb dieser Arbeit hergestellte DNA-Konstrukte wurde bei der Firma Seqlab GmbH (Göttingen) durchgeführt.

3.6 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR (PCR-Screening)

Zur Identifizierung von Insert-positiven Bakterienklonen nach der Klonierung wurde ein PCR-Screening eingesetzt. Hierzu wurden 15 bis 20 Klone (von einer LB-Ampicillin-Agar-Platte) in jeweils 15 µl A. bidest resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden in einem PCR-Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit Insert-spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über konventionelle Agarose-Gelelektrophorese auf die Anwesenheit und die Größe der DNA-Fragmente überprüft.

3.7 Transformation von Bakterien

3.7.1 Präparation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien des *E. coli* Stammes DH5 α erfolgte nach der Methode von Hanahan *et al.* (1985).

3.7.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Transformation wurden 1 bis 10 ng Plasmid-DNA mit 100 μ l auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufgehend wurde die mit der DNA gemischte Bakteriensuspension für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Platte, die 100 μ g des Antibiotikums Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.8 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung und Beurteilung der Qualität der DNA erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Der Quotient aus 280/260 nm, der optimal bei 1,8 liegt, gibt die Reinheit der DNA an.

3.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgte mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“ (s. Kap. 2.11) nach der Methode von Bradford (1976). 5 μ l der Proteinlösung wurden mit 200 μ l Bradford-Reagenz versetzt und mit H₂O auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach 5 bis 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

3.10 Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten

Die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität transient transfizierter eukaryontischer Zellen erfolgte nach Brockmann *et al.* (1996). 24 h nach Transfektionsstop (s. Kap. 3.3.1) wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS⁻ (s. Kap. 2.13) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und für 1 min bei 600 x g, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Schockgefrieren (5 min) auf Trockeneis und Auftauen (2 min) im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 52000 x g und 4°C 5 min pelletiert und der klare Überstand (Gesamtzellextrakt) abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976; s. Kap. 3.9).

Zur Bestimmung der CAT-Aktivität wurden 30 µg Gesamtzellextrakt, 2 µl [¹⁴C]-Chloramphenicol (s. Kap. 2.12), 25 µl einer 4 mM Acetyl-CoA-Lösung (in 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5; s. Kap. 2.1) gemischt und mit 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5 das Probenvolumen auf 150 µl eingestellt. Der Ansatz wurde 15 min bis 2 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Chromatographie zur Auftrennung des acetylierten Chloramphenicols erfolgte auf Dünnschichtchromatographieplatten (s. Kap. 2.9) für 45 min in einer dampfdruckgesättigten DC-Kammer. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform :Methanol (Verhältnis 19:1). Nach Trocknung der Dünnschichtchromatographieplatten wurde die Quantifizierung des [¹⁴C]-markierten Chloramphenicols (und somit der CAT-Aktivität) mit dem „Automatic TLC-Linear Analyzer“ der Firma Berthold (s. Kap. 2.10) durchgeführt.

3.11 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden subkonfluent gewachsene Zellen mit 4°C kaltem PBS⁻ (s. Kap. 2.13) gewaschen und durch Abschaben geerntet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension im Lysepuffer (s. Kap. 2.13) und Schütteln für 30 min bei 4°C. Die Zelltrümmer wurden bei 52000 x g und 4°C 30 min pelletiert und der klare Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976; s. Kap. 3.9).

3.12 Präparation von Kernextrakt

Die Präparation von Kernextrakt erfolgt nach einer modifizierten Methode von Dignam *et al.* (1983). Die Zellen wurden hierfür auf Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80% kultiviert. Nach Erreichen dieser Konfluenz wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und für 10 min bei 600 x g, 4°C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

Das Zellpellet wurde in dem 3- bis 5-fachen Zellvolumen Kernextrakt-Puffer A (s. Kap. 2.13) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Hiernach erfolgte der Aufschluss der Zellen mit etwa 10 bis 30 Hüben in einem Dounce-Homogenisator, wobei der Zellaufschluss unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft wurde. Anschließend wurden die freigesetzten Zellkerne für 15 min bei 600 x g abzentrifugiert. Der Überstand (Cytoplasmaextrakt) wurde verworfen und das Zellkernpellet wurde zweimal in Kernextrakt-Waschpuffer (s. Kap. 2.13) vorsichtig resuspendiert und sofort für 10 min bei 600 x g abzentrifugiert.

Das Zellkernpellet wurde danach in Kernextrakt-Puffer C (30 µl Kernextrakt-Puffer C pro 2×10^6 Zellen, s. Kap. 2.13) homogenisiert und anschließend für 60 min gemischt. Danach wurde für 30 min bei 51700 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes (Kernextrakt) mit dem Bradford-Reagenz (s. Kap. 3.9) bestimmt. Die Kernextrakte wurden anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.13 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellem Extrakt erfolgte durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose 4B (s. Kap. 2.9). Hierfür wurden prokaryontische Expressionsvektoren des pGEX-Systems (s. Kap. 2.9), welche nach Induktion mit IPTG die entsprechende cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminal gekoppelten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* exprimieren, in Bakterien des *E. coli* Stammes BL21 transformiert. Für die anschließende Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde ein Einzelklon der transformierten Bakterien in 100 ml Selektions-LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit Selektions-LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert (37°C, 200 rpm).

Nach Erreichen dieser OD_{600} wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (s. Kap. 2.13) in einer Endkonzentration von 100 mM zum LB-Medium für 2 h induziert. Nach dem Induktionsende wurden die Bakterien für 10 min bei 2200 x g durch Zentrifugation geerntet und in 10 ml NETN-Puffer (s. Kap. 2.13) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 1 ml einer 10 mg/ml LysozymbLösung (s. Kap. 2.2) pro ml Bakteriensuspension für 30 min bei 4°C und einer anschließenden Ultraschallbehandlung (6 x 10 s, Stufe 5). Danach wurde bei 6200 x g, 4°C für 20 min zentrifugiert und das Lysat mit 300 µl Glutathion-Sepharose (äquibriert in NETN-Puffer) vermischt.

Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose erfolgte für 1 h bei 4°C auf einem Schüttelrad. Dann wurde das Lysat-Glutathion-Sepharose Gemisch abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und dreimal mit 5 ml NETN-Puffer gewaschen. Die an Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsproteine wurden anschließend in 200 µl NETN-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Proteinkonzentration der GST-Fusionsproteine mit dem Bradford-Reagenz bestimmt, die Fusionsproteine aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur qualitativen Bestimmung der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden 10 µg der Fusionsproteine in 30 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

Die Elution nativer GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Sepharose durch reduziertes Glutathion erfolgt nach den Angaben des Herstellers Amersham Pharmacia Biotech.

3.14 *In vitro* Transkriptions/Translations-System

Die *in vitro* Expression von Proteinen erfolgte mit einem gekoppelten Transkription/Translation-System der Firma Promega (T7/T3/SP6 „TNT Coupled Transcription/Translation Systems“; s. Kap. 2.11). Es wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, außerdem wurde jedem Translationsansatz 33 Units RNasin RNase Inhibitor zugefügt. Die Effizienz der Transkription/Translation wurde anschließend mittels eines Inkorporationsassays nach Angaben des Herstellers überprüft. Außerdem erfolgte eine quantitative und qualitative Analyse der Translations-Produkte in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap 3.15.1) mit anschließender Fluorographie (s. Kap. 3.15.3).

3.15 Analyse von Proteinen

3.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Die Trenngele (im Bereich von 6-18%, C-Wert: 2,7%) und Sammelgele (5%, C-Wert: 2,7%) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) vermischt und 5 min gekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer (Biorad, München).

Nach dem Gellauf wurden nicht radioaktiv markierte Proteine durch Western-Blotting (s. Kap. 3.15.2) und mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markierte Proteine durch Fluorographie (s. Kap. 3.15.3) nachgewiesen.

3.15.2 Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen in Extrakten aus Kulturzellen wurden die Extrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektroblothing (Semi-Dry-Blot-Apparatur, 1–2 h, 1,7 mA/cm²) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C-extra) transferiert. Die Membran wurde vor dem Blotten durch kurzes Waschen in H₂O und einer nachfolgenden zehnminütigen Äquilibration in Transferpuffer aktiviert. Der Transfer von Proteinen bis 180 kDa erfolgte für 1 h in Transferpuffer mit 0,037% SDS und für Proteine über 180 kDa für 2 h in Transferpuffer mit 0,8% SDS.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h mit 1 x TBS-T/10% Milchpulver unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur blockiert und anschließend in derselben Lösung für 1 bis 2 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1 : 250 bis 1 : 5000 je nach Antikörper) inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den F_c-Anteil des Primär-Antikörpers gerichtet ist, für 1 h in TBS-T/1% Milchpulver (Verdünnung 1 : 2000 bis 1 : 150000 nach Angabe des Herstellers) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3 x 10 min TBS-T, 2 x 5 min TBS) erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe durch das Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz-

Detektionssystem gemäß den Angaben des Herstellers. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurden die Röntgenfilme 5 s bis 30 min exponiert.

Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in TBS-0,2% Tween-20 für 45 min bei 70°C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und einer erneuten Antikörperreaktion unterzogen.

3.15.3 Fluorograophie

Zur Detektion der [³⁵S]-markierten Proteine wurde die Fluorographie eingesetzt. Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Gele bei Raumtemperatur für 30 min in 100 ml Gelfixierlösung (50% 2-Propanol/7% Essigsäure) unter Schütteln inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Gel zweimal für je 5 min mit H₂O gewaschen und für 30 min unter leichtem Schütteln in einer Verstärkerlösung (Amplify) inkubiert. Das Gel wurde hiernach auf Whatman-Papier überführt, bei 60°C auf einem Vakuumtrockner getrocknet und bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.16 GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen

Für GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Proteinen (s. Kap. 3.14) wurden zwischen 1 bis 25 µg der entsprechenden, an Glutathion-Sepharose immobilisierten, GST-Fusionsproteine (s. Kap. 3.13) mit 1 x 10⁵ cpm eines *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Proteins inkubiert.

Die Bindungsreaktionen erfolgten in 500 µl PC+150-Puffer (s. Kap. 2.13) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die über Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Fusionsprotein-Protein-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und fünfmal mit je 1 ml PC+150-Puffer gewaschen. Die Protein-Komplexe wurden anschließend in 30 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Detektion der [³⁵S]-markierten Proteine mittels Fluorographie wurde nach dem Gellauf das Gel für 30 min in 100 ml Gelfixierlösung inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Gel zweimal für je 5 min mit H₂O gewaschen und für 30 min unter leichtem Schütteln in einer Verstärkerlösung (Amplify) inkubiert. Das Gel wurde hiernach auf Whatman-Papier

überführt, bei 60°C auf einem Vakuumtrockner getrocknet und bei -80°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.17 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden Kernextrakte wie unter Abschnitt 3.12 beschrieben präpariert und eingesetzt. Hierfür wurden KB-Zellen durch Lipofektion oder Elektroporation transient transfiziert (s. Kap.3.3). 48 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit PBS⁻ (s. Kap. 2.13) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und für 10 min bei 600 x g, 4°C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

Die für die Präzipitation verwendete Protein-A-Sepharose (30-60 µl pro Ansatz) wurde zunächst 3 x mit je 1 ml IP+150-Puffer (s. Kap. 2.13) gewaschen und anschließend für 1 bis 2 h im IP+150-Puffer, welcher zusätzlich 0,5% BSA enthielt, auf einem Schüttelrad äquilibriert. Zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine (Preclearing) wurde der Kernextrakt in einem Gesamtvolumen von 500 bis 600 µl zusammen mit 1 bis 2 µg eines unspezifischen Antikörpers (normal rabbit IgG) ebenfalls unter Schütteln über einen Zeitraum von 1 bis 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 600 x g pelletiert und die Kernextrakte zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 4°C geschüttelt, anschließend bei 4°C und 600 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach dem Preclearing wurde dem Überstand ein spezifischer Antikörper (1 bis 2 µg) zugegeben und dieser Ansatz 3 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 30-60 µl äquilibrierter Sepharose wurde dieser Ansatz unter Schütteln weitere 12 bis 16 h bei 4°C inkubiert. Die an den Proteinanteil der Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und fünfmal mit jeweils 1 ml IP+150-Puffer gewaschen.

Die Sepharose mit den Proteinkomplexen wurden anschließend in 30 µl 1 x Laemmli-Puffer für 5 min gekocht. Die Immunkomplexe wurden durch Zentrifugieren (600 x g, 1 min, RT) von Protein A-Sepharose getrennt und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach dem Gellauf wurden die Proteine wie in Kap. 3.15.2 beschrieben auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und durch Western-Blotting nachgewiesen.

3.18 DNA-Protein-Interaktionsanalysen

Die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen *in vivo* wird durch die Chromatin-Immunpräzipitation ermöglicht. Chromatin-Immunpräzipitationen (CHIP) wurden nach Protokollen von Dedon *et al.* (1991), Braunstein *et al.* (1993) und Luo *et al.* (1998) durchgeführt.

3.18.1 Chromatin-Immunpräzipitation

Für die Chromatin-Immunpräzipitationen wurden 2×10^6 KB- oder C33A-Zellen mit Reportergenkonstrukten wie in Kap. 3.3.1 beschrieben transfiziert. Um Proteine mit DNA querverzuzusetzen, wurde 40 h nach Transfektion Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% zum Zellkulturmedium gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS⁻ (s. Kap. 2.13) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und bei 600 x g, 4°C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C.

Das Zellpellet wurde in 200 µl CHIP-Lyse-Puffer (s. Kap. 2.13) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die DNA in eine immunpräzipitierbare Größe zwischen 200 bis 1000 bp zu überführen, wurde das Lysat fünfmal für 10 s pulsierend auf Eis beschallt (Stufe 3). Dann wurde das Lysat für 10 min bei 18000 x g zentrifugiert.

Ein Drittel des Überstandes wurde benutzt, um die Konzentration des betreffenden Reporterkonstrukts in den transfizierten Zellen zu quantifizieren (im Folgenden als Total bezeichnet). Die restlichen Zweidrittel des Überstandes wurden fünffach mit CHIP-Lyse-Puffer verdünnt und mit 5 µl eines anti-hBRG1-Antikörpers bzw. eines anti-acetyl H4-Antikörpers oder einem Kontrollantikörper (s. Kap. 2.3) auf einem Schüttelrad für 16 h inkubiert. Die Immunkomplexe wurden für 2 h mit 60 µl Protein A-Sepharose (s. Kap. 2.9), die ebenfalls für 16 h in CHIP-Lyse-Puffer und 10 µg gescherter Heringssperma-DNA äquilibriert wurde, inkubiert.

Hiernach wurden die gebildeten, über Protein A-Sepharose immobilisierten Immunkomplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und anschließend fünfmal mit je 1 ml CHIP-Wasch-Puffer A, CHIP-Wasch-Puffer B, CHIP-Wasch-Puffer C (s. Kap. 2.13) und TE pH 8 gewaschen. Die Trennung der Immunkomplexe von Protein A-Sepharose erfolgte durch die Zugabe von 250 µl Elution-Puffer (0,1 M NaHCO₃/ 1% SDS) und 15 minütiger Inkubation auf einem Schüttelrad bei Raumtemperatur. Nach anschließender Zentrifugation

(78 x g, 1 min) wurde die DNA-Protein-Quervernetzung für 5 h bei 65°C revertiert, gefolgt von einem Proteinase K-Verdau für 1 h bei 50°C. Die DNA wurde nachfolgend durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, über Nacht bei -20°C präzipitiert (wobei 20 µg Glycogen als inerte Fällungshilfe zugesetzt wurde) und in H₂O aufgenommen. Die Detektion der Promotorfragmente erfolgte über PCR (Denaturierung: 94°C, 1 min ; Anlagerung: 55°C, 1 min; Synthese: 72°C, 1 min; 20 Zyklen), wobei je 1 µl der Probe in die PCR eingesetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden über konventionelle Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4. Ergebnisse

Als Transkriptionsfaktoren erfüllen adenovirale E1A-Proteine essentielle Funktionen im viralen Replikationszyklus, da sie einerseits die Expression aller anderen viralen Gene aktivieren und andererseits die zelluläre Genexpression so modulieren, dass eine effiziente Virusvermehrung möglich ist (Bayley und Mymryk, 1994; Flint und Shenk, 1997). Die E1A-Proteine besitzen keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985). Ihre genregulatorischen Funktionen werden durch die Interaktion mit zellulären, an der Transkriptionsregulation beteiligten Faktoren, vermittelt (s. Kap. 1.4). Da sowohl virale DNA, nach dem Eintritt in den Zellkern, als auch zelluläre DNA als Chromatin organisiert vorliegen, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren für die Aktivierung der Expression adenoviraler Gene und die Modulation der zellulären Genexpression von besonderer Bedeutung.

Zu Beginn meiner Untersuchungen waren bereits Interaktionen der E1A-Proteine mit Chromatin-modifizierenden Faktoren, wie z. B. CBP/p300, bekannt (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1999; Fax *et al.*, 2000). Immer noch ungeklärt war jedoch die Frage, ob es bei der E1A-vermittelten Genregulation zu einer Interaktion mit Untereinheiten der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe kommt. Die Untersuchungen diesbezüglich wurden im Zuge meiner Arbeit mit Hilfe des adenoviralen E2-Promotors des onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 (im Folgenden als E2_{Ad12}-Promotor bezeichnet) durchgeführt.

4.1 Der E2_{Ad12}-Promotor als Modellsystem

Die adenovirale E2-Region kodiert für Proteine, einem Einzelstrang-DNA-Bindeprotein, dem Vorläufer des sog. Bellet-Proteins und der DNA-Polymerase, welche für die virale DNA-Replikation während des produktiven Entwicklungszyklus von Adenoviren essentiell sind. Die Expression der E2-Region wird im Verlauf der adenoviralen Infektion durch den sog. E2-Promotor gesteuert (Swaminathan und Thimmapaya, 1995).

Die E2-Promotorregion des onkogenen Serotyps 12 umfaßt einen 420 bp langen Bereich des Ad12-Genoms (nt 25921-2550; Sprengel *et al.*, 1994). Mutationsanalysen haben gezeigt, dass für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors der Promotorbereich von nt -420 bis

-140 nicht essentiell ist. Die für die Transkriptionsaktivierung verantwortlichen *cis*-regulatorischen Promotorelemente liegen in einem 140 bp-umfassenden Promotorbereich (nt 25641 bis nt 25501 im adenoviralen Genom; Abb. 6), welcher die Konsensussequenzen für ein cAMP-Response-Element (im Folgenden als E2-CRE bezeichnet, nt -99 bis -92; relativ zum +1 definierten Transkriptionsstart; Abb. 6), ein E2F-Element (nt -89 bis -82; Abb. 6) und eine TATA-Box (nt -29 bis -24; Abb. 6) beinhaltet. Diese Transkriptionsfaktorbindestellen sind zwischen den Ad12 und Ad2/Ad5 E2-Promotoren konserviert. Die nicht-onkogenen Adenovirus-Serotypen 2 und 5 besitzen eine weitere Konsensussequenz für ein E2F-Element. Die E2F-Bindestelle, die für die Aktivierung des Ad2/5 E2-Promotors essentiell ist, spielt bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors keine Rolle (Swaminathan und Thimmapaya, 1995; Fax *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu dem Ad2/5 E2-Promotor verläuft die Aktivierung des Ad12 E2-Promotors ausschließlich über die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1.

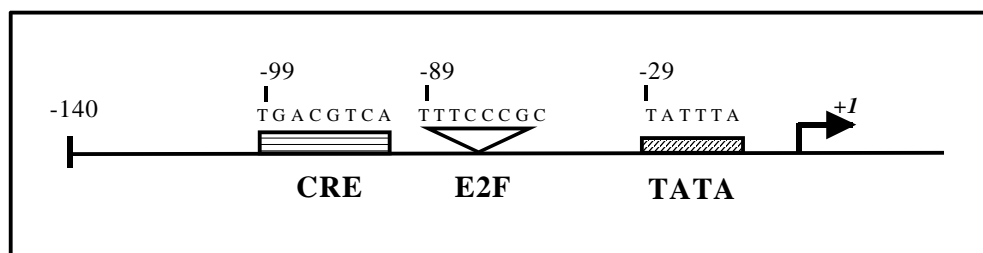


Abb. 6 Schematische Darstellung der minimalen E2-Promotorregion von Ad12. Der nach Sprengel *et al.* (1994) definierte E2_{Ad12}-Promotorbereich ist schematisch dargestellt. Dieser Bereich umfaßt ein 140 bp langes Fragment des E2_{Ad12}-Promotors (nt 25641 bis nt 25501 im adenoviralen Genom). Das E2-CRE-Element, die E2-E2F-Erkennungssequenz und die TATA-Box sind dargestellt. Die Positionen und Sequenzen der Promotorelemente relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1) sind angegeben.

Der E2_{Ad12}-Promotor wird gleichermaßen von dem E1A_{12S}- und dem E1A_{13S}-Protein aktiviert. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass der N-Terminus und die konservierte Region 1 (CR1) des E1A_{12S}-Proteins für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors essentiell sind (Moran, 1994; Lipinski *et al.*, 1999). Das entscheidende Promotorelement für die E1A_{12S}-induzierte Transkription des E2_{Ad12}-Promotors ist das E2-CRE, welches von den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 gebunden wird. Diese DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren rekrutieren ihrerseits das E1A_{12S}-Protein an den viralen Promotor (Fax *et al.*, 2000). Die anschließende Interaktion mit den zellulären Koaktivatoren CBP/p300, welche für das transaktivierende Potential der Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 von entscheidender Bedeutung sind (Montminy, 1997), führt zur Bildung eines ternären Komplexes, bestehend aus CREB-1/ATF-1, dem

E1A_{12S}-Protein und den Koaktivatoren CBP/p300. Hierbei wurde u. a. in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Ad12 E1A_{12S}-Protein mit der N-terminalen Domäne, der Kinase-Interaktions (KIX)-Domäne, der Cystein/Histidin-reichen (C/H3)-Domäne und der Glutamin-reichen C-terminalen (CAD) Aktivierungsdomäne von CBP/p300 interagieren kann (Kurokawa *et al.*, 1998; Lipinski *et al.*, 1999). Fax *et al.* (2000) haben gezeigt, dass das adenovirale E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von CBP aktiviert und dass die Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität der Promotor-gebundenen Koaktivatoren CBP/p300 für die Aktivierung des viralen E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein entscheidend ist.

4.2 ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Faktoren sind an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt

Nach dem Eintritt in den Zellkern wird virale-, wie auch transient transfizierte DNA, durch die Wechselwirkung mit zellulären Histonen in Chromatin-ähnlichen Strukturen verpackt (Dery *et al.*, 1985; Shenk, 1996; Luo *et al.*, 1998). Dies ist ein notwendiger Prozess, der zum einen die DNA vor dem zellulären Abbau schützt und zum anderen die physiologische Struktur der Matrize für zelluläre RNA-Polymerase darstellt.

Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien haben belegt, dass Chromatin eine Barriere für die Transkription darstellt. Durch die nukleosomale Struktur wird die Assoziierung von RNA-Polymerase-II-Holoenzym am Zielpromotor reprimiert und dadurch die Initiation der Transkription inhibiert (Kornberg und Lorch, 1999). Die Überwindung dieser Repression geschieht durch die spezifische Rekrutierung von Chromatin-remodellierenden Faktoren, deren Aktivität zu einer lokalen und transienten Destabilisierung der nukleosomalen Struktur führt. Hierdurch können regulatorische Proteine bzw. Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie an ihre Zielsequenzen auf der DNA binden (s. Kap. 1.5; Kingston und Narlikar, 1999).

Die Frage nach einer möglichen Beteiligung von ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden humanen SWI/SNF-Komplexen (hSWI/SNF) an der E1A_{12S}-vermittelten Genregulation und die Fähigkeit in Gegenwart von E1A_{12S} die Expression des E2_{Ad12}-Promotors zu modulieren, wurde durch den Einsatz der ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe, BRG1 und BRM, welche als einzige Untereinheiten für die Chromatin-remodellierende Aktivität der Komplexe verantwortlich sind (Phelan *et al.*, 2000), untersucht. Hierzu wurde in transienten Expressionsanalysen das Reporterkonstrukt

E2_{Ad12}(140bp)-CAT (im weiteren Verlauf als E2_{Ad12}-CAT bezeichnet; Abb. 7A) mit Expressionsvektoren für hBRG1 oder hBRM und/oder das E1A_{12S}-Protein in KB-Zellen kotransfiziert. Erwartungsgemäß führte die transiente Expression des E1A_{12S}-Proteins zu einer 7,9-fachen Aktivierung der CAT-Genexpression (Abb. 7B; Fax *et al.*, 2000). Wie in Abb. 7B ebenfalls dargestellt, war in Abwesenheit des E1A_{12S}-Proteins keine der eingesetzten ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Die Koexpression von hBRM und das E1A_{12S}-Protein bewirkte nur eine geringfügig erhöhte Aktivierung des Reporterkonstrukts (8,5-fach; Abb. 7B). Interessanterweise führte die Koexpression von hBRG1 und E1A_{12S} zu einer 20-fach erhöhten Aktivierung des Reportergens (Abb. 7B).

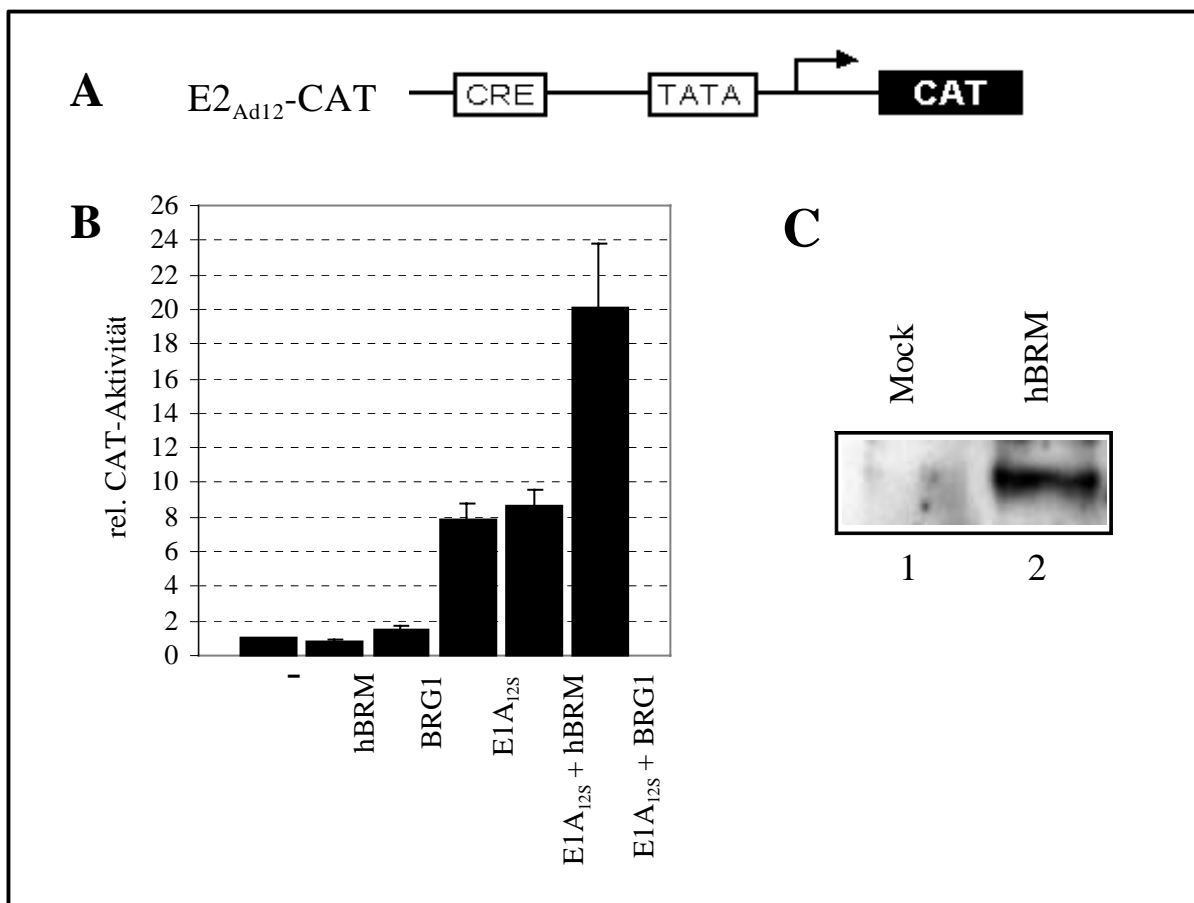


Abb. 7 hBRG1 kooperiert mit dem E1A_{12S}-Protein bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. **A.** Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT. Die CAT-Genexpression im Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT wird durch ein 140bp-Fragment des E2_{Ad12}-Promotors reguliert (nt 25641 bis nt 25501 im adenoviralen Genom). Das E2-CRE-Element und die TATA-Box sind dargestellt. **B.** KB-Zellen wurden mit je 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und pRc/RSV-E1A_{12S}-, pCG-hBRM- und pBJ5-hBRG1-Expressionsvektor wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor pRc/RSV konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert. **C.** Expression von hBRM in transfizierten Zellen. Gesamtzellextrakt aus KB-Zellen wurde mittels Western-Blot auf die Expression von hBRM überprüft.

Dass die Unfähigkeit von hBRM zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors nicht auf eine ineffektive Expression dieses Proteins in den transfizierten Zellen zurückzuführen war, wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Abb. 7C). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass nur die hBRG1-Untereinheit an der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt ist.

Zur weiteren Bestätigung einer Kooperation zwischen dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein und hBRG1 wurde das Gal4-Expressionssystem eingesetzt. Das Reporterkonstrukt G5-E1B/TATA-CAT (enthält fünf Bindestellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4) wurde hierzu mit einem pRc/RSV-Gal4-E1A_{12S}- und/oder einem hBRG1-Expressionsvektor in KB-Zellen transfiziert. Der Expressionsvektor pRc/RSV-Gal4-E1A_{12S} kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und dem E1A_{12S}-Protein, welches einen Aktivator der CAT-Genexpression des Reporterkonstrukts G5-E1B/TATA-CAT darstellt (Lipinski *et al.*, 1997).

Wie aus Abb. 8A ersichtlich, führte die Expression des Gal4-E1A_{12S}-Proteins zu einer 6,5-fachen Aktivierung des G5-E1BTATA-Promotorkonstrukts. Die Gal4-E1A_{12S}-Proteinabhängige Aktivität des Reportergens konnte durch die Koexpression von hBRG1 auf das 14,5-fache erhöht werden (Abb.8A).

Die Expression des Gal4-E1A_{12S}-Fusionsproteins wird durch den gleichen RSV-Promotor reguliert wie in dem pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor. Um auszuschließen, dass die hBRG1-vermittelte Aktivierung nicht durch eine erhöhte Expression des E1A_{12S}-Proteins vom kotransfizierten pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor bewirkt wurde, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen haben bestätigt, dass die E1A_{12S}-Proteinexpression in den transfizierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit von ectopisch exprimierten hBRG1 vergleichbar ist (Abb. 8B, obere Darstellung). Durch Behandlung desselben Blots mit einem Antikörper, der gegen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A gerichtet ist (anti-PKA α -cat, Abb. 8B, untere Darstellung), konnte ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Proteinmengen für die unterschiedlichen Signalstärken verantwortlich sind. Bei diesen Untersuchungen wurde auch die effektive Expression von hBRG1 in den transfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 8B, mittlere Darstellung).

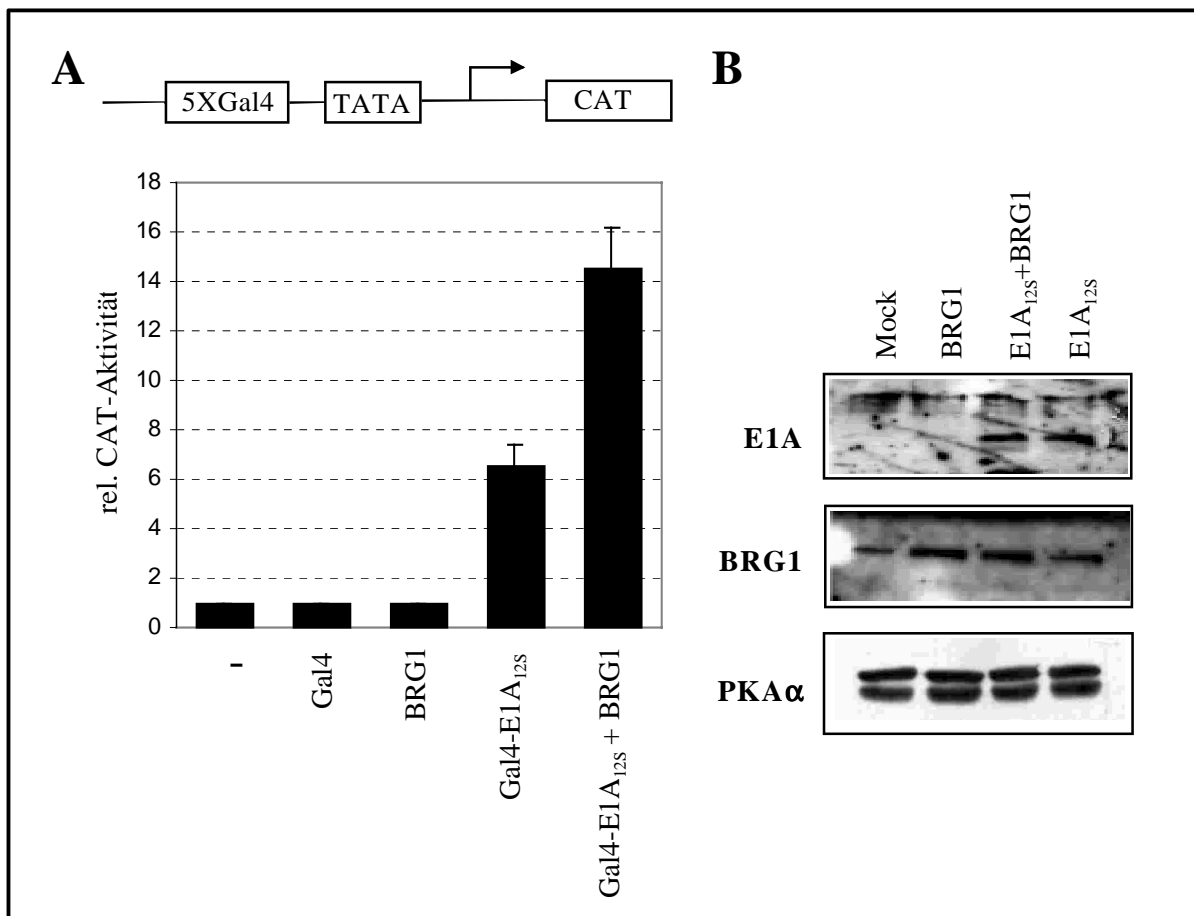


Abb. 8 hBRG1 kooperiert mit dem E1A_{12S}-Protein bei der Aktivierung der Reporterexpression.

A. KB-Zellen wurden mit 0,2 µg des Reporterkonstrukts G5-E1B/TATA-CAT und 1 µg des Gal4-E1A_{12S}-Expressionsvektors oder entsprechendem Leervektor, und 1 µg pBJ5-hBRG1 Expressionsvektor wie angegeben kotransfiziert. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts G5-E1BTATA-CAT in Anwesenheit des Leervektors wurde als 1 normiert. Das Reporterkonstrukt ist schematisch dargestellt. 5XGal4 bezeichnet fünf Bindestellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4. **B.** Expressionsnachweis des E1A_{12S}-Proteins in transfizierten KB-Zellen. Gesamtzellextrakte von Kontroll-transfizierten, pRc/RSV-E1A_{12S}- und/oder pBJ5-hBRG1-transfizierten Zellen wurden mittels Western-Blot mit dem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Als Auftragungskontrolle wurde derselbe Blot mit einem Antikörper, der gegen PKAα-cat gerichtet ist, analysiert. Die Gesamtzellextrakte wurden zur Analyse der Expression von hBRG1 in transfizierten Zellen, unter Verwendung eines anti-hBRG1 Antikörpers, eingesetzt.

Zusammenfassend kann aus den oben beschriebenen transienten Expressionsanalysen geschlossen werden, dass von den getesteten ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Faktoren nur hBRG1 bei der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen eine Rolle spielt. Dagegen scheint hBRM nicht an der E1A_{12S}-vermittelten Regulation des E2_{Ad12}-Promotors in diesen Zellen beteiligt zu sein.

4.3 Die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein und hBRG1 ist abhängig vom N-Terminus und der CR1-Domäne des adenoviralen Proteins

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass das E1A_{12S}-Protein von Ad12 neben der CR1-Domäne eine zweite, unabhängige Transaktivierungsdomäne im N-Terminus (As 1-29) enthält (Lipinski *et al.*, 1997). Beide Transaktivierungsdomänen sind an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein beteiligt (Moran, 1994; Fax *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob beide Domänen auch für die Kooperation mit hBRG1 zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig sind, wurden transiente Expressionsanalysen durchgeführt.

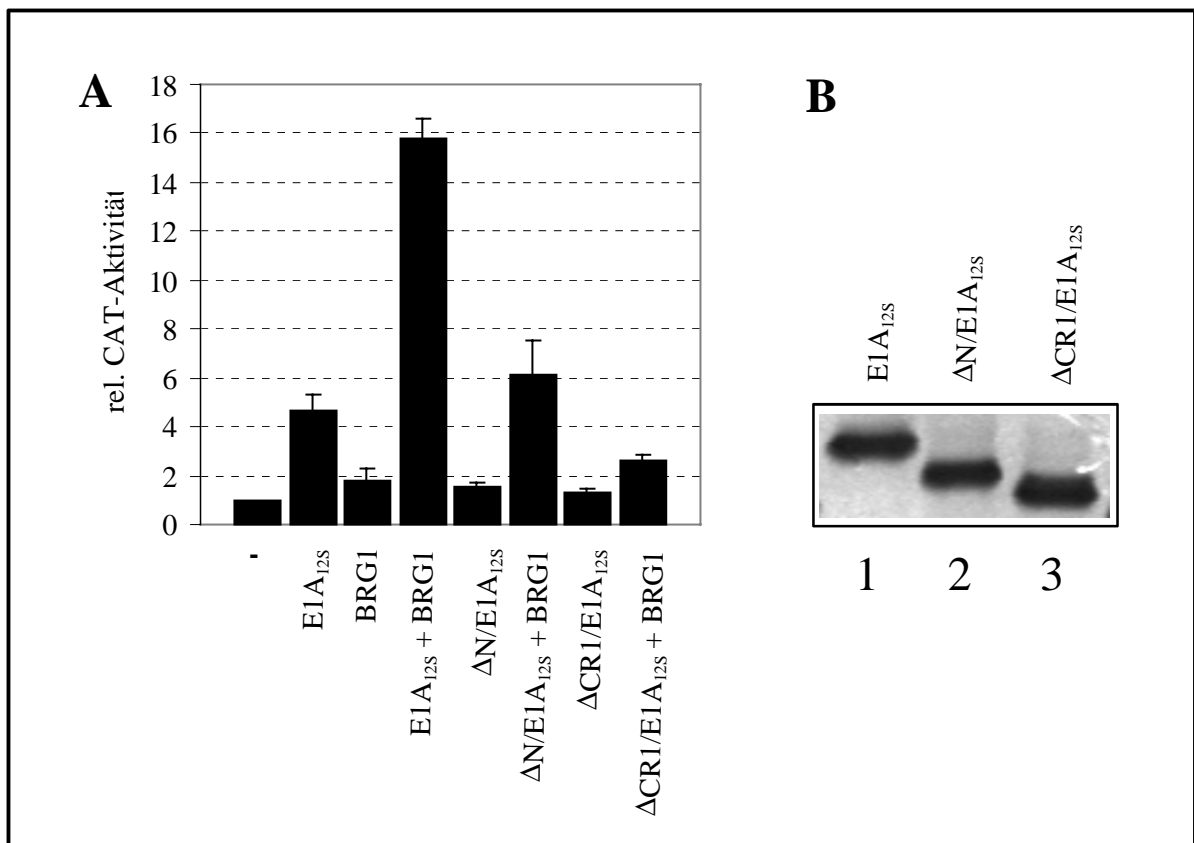


Abb. 9 Das E1A_{12S}-Protein kooperiert mit hBRG1 zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in Abhängigkeit vom N-Terminus und der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins. **A.** KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und 1 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-Wildtyp und davon abgeleiteten Mutanten und 1 µg pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionseende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert. **B.** Kontrolle der Expression der E1A_{12S}-Proteinmutanten in transfizierten Zellen. Gesamtzellextrakte aus KB-Zellen wurden mittels Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert.

Hierzu wurde das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT mit den Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein und die davon abgeleiteten Proteinmutanten, bei denen der N-Terminus (As 1-29; Δ N/E1A_{12S}) oder die CR1-Domäne (As 39-79; Δ CR1/E1A_{12S}) deletiert wurde, und hBRG1 in KB-Zellen kotransfiziert. Wie in Abb. 9A dargestellt, war weder hBRG1 noch eine der eingesetzten E1A_{12S}-Proteinmutanten allein in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Die Koexpression von hBRG1 und den E1A_{12S}-Proteinmutanten führte zu einer starken Reduktion (Δ N/E1A_{12S}) oder einem vollständigen Verlust (Δ CR1/E1A_{12S}) der CAT-Expression (Abb. 9A).

Dass die Reduktion oder der Verlust der hBRG1-vermittelten E2_{Ad12}-Promotoraktivierung nicht auf eine unterschiedliche Konzentration der E1A_{12S}-Proteinmutanten in den transfizierten Zellen zurückzuführen war, wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Abb. 9B). Diese Daten beweisen, dass für die kooperative Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein und hBRG1 sowohl die N-terminale Domäne, als auch die CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins von entscheidender Bedeutung sind.

4.4 Das E1A_{12S}-Protein bindet in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne an hBRG1 *in vitro*

Die Daten aus den transienten Expressionsstudien zeigen, dass hBRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors kooperiert (s. Kap. 4.2 und 4.3). Eine Möglichkeit, wie die transkriptionsaktivierende Funktion von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor rekrutiert werden könnte, besteht daher in einer direkten Interaktion von hBRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein. Um zu prüfen, ob das E1A_{12S}-Protein mit der ATPase-Untereinheit des hSWI/SNF-Komplexes BRG1 *in vitro* interagiert, wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen (s. Kap. 3.16) mit verschiedenen GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen und [³⁵S]-markiertem, *in vitro* transkribiertem/translatiertem hBRG1 durchgeführt.

Wie aus Abb. 10A ersichtlich, bindet hBRG1 an das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein (Spur 3). Die Deletion der N-terminalen Domäne (GST- Δ N/E1A_{12S}; Abb. 10A, Spur 4) oder der CR1-Domäne (GST- Δ CR1/E1A_{12S}; Abb. 10A, Spur 5) bewirkt eine starke Reduktion des Bindungspotentials des E1A_{12S}-Proteins an hBRG1. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser *in vitro*-Bindungsstudien mit den transienten Expressionsanalysen zeigt, dass die Interaktion von BRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein mit der Fähigkeit dieser Proteine, den E2_{Ad12}-Promotor zu aktivieren, korreliert (vgl. Abb. 7B, Abb. 9A und Abb. 10A).

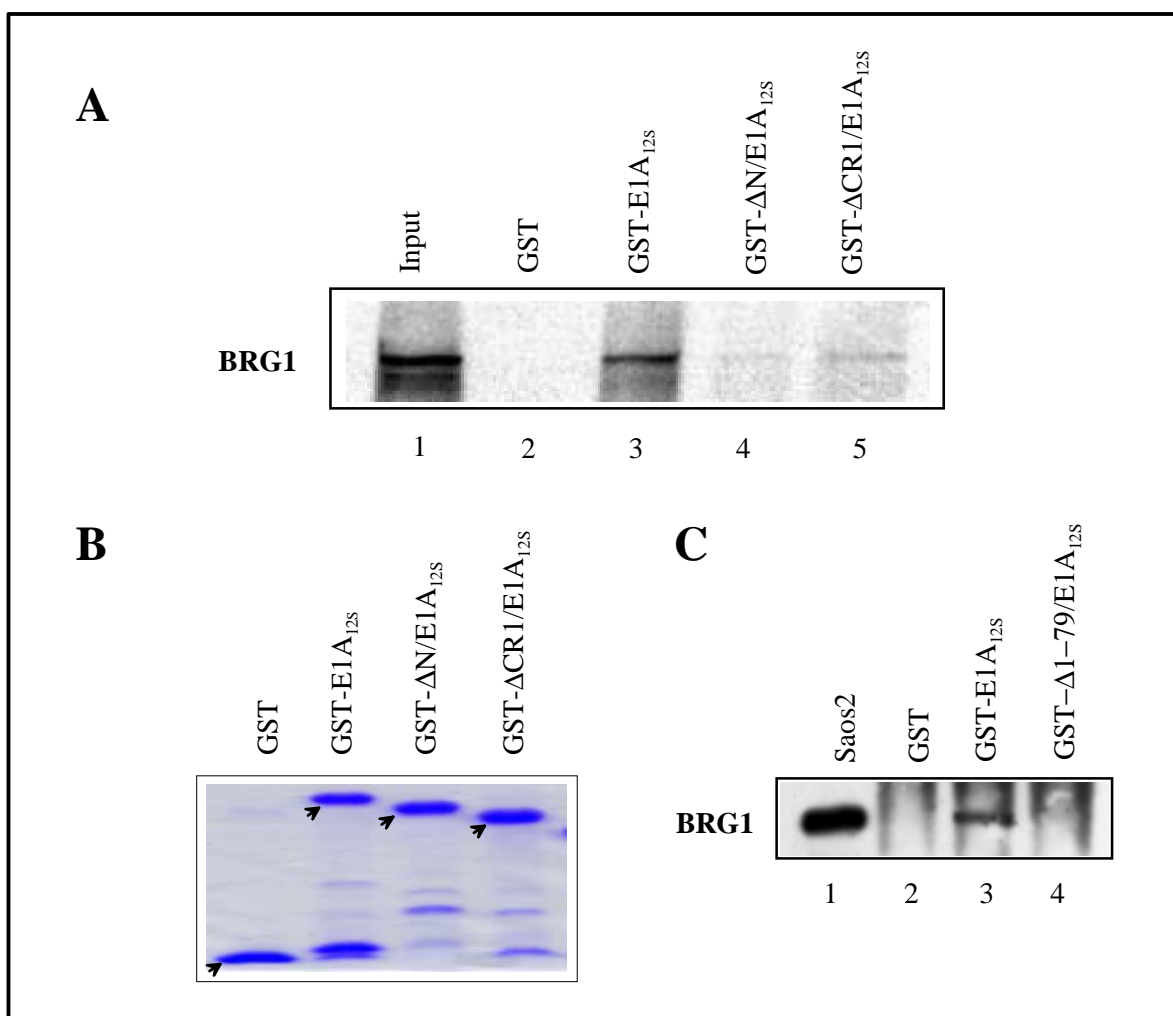


Abb. 10 hBRG1 interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro*. **A.** Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde *in vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes hBRG1 mit der GST-Proteindomäne (Spur 2) oder verschiedene GST-E1A_{12S}-Fusionsproteine (Spuren 3 bis 5) wie angegeben inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf 6 %-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Spur 1 repräsentiert des Inputs von [³⁵S]-hBRG1. **B.** Kontrolle der Mengen der unter A eingesetzten GST-Fusionsproteine in den GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimenten. Gleiche Aliquots der GST-Fusionsproteine wurden auf 12 %-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert. **C.** Saos2-Gesamtzellextrakt wurde mit der GST-Proteindomäne (Spur 2), GST-E1A_{12S}- oder GST-Δ1-79/ E1A_{12S}-Fusionsproteinen (Spuren 3 und 4) wie angegeben inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf 6 %-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-hBRG1-Antikörper analysiert. Als Western-Blot-Kontrolle wurde in der Spur 1 Gesamtzellextrakt aus Saos2-Zellen aufgetragen.

Interessanterweise haben die E1A_{12S}-Proteinmutanten, welche kein oder nur ein schwaches Potential zur Kooperation mit hBRG1 bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors besitzen (Abb. 9A), nur eine geringe Affinität zu hBRG1 *in vitro* (Abb. 10A). Diese Daten verdeutlichen, dass eine physikalische Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und hBRG1 im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors von Bedeutung ist.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde das GST-E1A_{12S}-Wildtyp-Fusionsprotein oder die GST-E1A_{12S}-Proteinmutante, bei der die CR1-Domäne und der N-Terminus (As 1-79, Δ 1-79/E1A_{12S}) deletiert war, mit Gesamtzellextrakt aus Saos2-Zellen, die einen hohen Level an endogenem hBRG1 aufweisen, inkubiert (Abb. 10C). Wie aus den Abb. 10C ersichtlich, bindet zelluläres hBRG1 an das E1A_{12S}-Protein (Spur 3). Die Deletion der Aminosäuren 1-79 des E1A_{12S}-Proteins führte zu einem Verlust der Interaktion mit BRG1 (GST- Δ 1-79/E1A_{12S}; Abb. 10C, Spur 4).

Kontrollexperimente belegten, dass vergleichbare Mengen an GST-Fusionsproteinen in den *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsanalysen eingesetzt wurden (Abb. 10B und Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass das E1A_{12S}-Protein mit hBRG1 *in vitro* interagiert und die N-terminale und die CR1-Domäne des adenoviralen E1A_{12S}-Proteins für eine effiziente Interaktion essentiell sind.

4.5 Die Interaktion von hBRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein ist abhängig von der HC- und der ATPase-Domäne des hBRG1-Proteins

Die ATPase-Untereinheiten der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe werden aufgrund ihrer Homologie, die nicht die ATPase-Domäne betreffen, in unterschiedlichen Gruppen zusammengefaßt (s. Kap. 1.7; Muchardt und Yaniv, 1999). Die *S. cerevisiae* SWI2/SNF2-ähnliche Gruppe der ATPase-Untereinheiten, zu der u. a. auch hBRG1 gezählt wird, enthalten außer der hoch-konservierten ATPase-Domäne, eine Bromodomäne (BD) am C-terminalen Ende und zwei weitere konservierte Domänen, die sog. Prolin-reiche (PR) und die Highly-Charged (HC) Domäne, welche am N-terminalen Ende lokalisiert sind (Abb. 11A; Khavari *et al.*, 1993).

Zur Identifizierung von hBRG1-Proteindomänen, die an der Bindung des E1A_{12S}-Proteins beteiligt sind, wurden die einzelnen hBRG1-Proteindomänen (BRG1-PR: As 1-350; BRG1-HC: As 351-729; BRG1-ATPase: As 730-1480; BRG1-BD: As 1481-1647) kloniert und ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem E1A_{12S}-Protein in GST-pull-down Experimenten (Fusionsprotein-Interaktionsanalysen) untersucht. Hierbei wurden jeweils die ³⁵S-markierten, *in vitro* transkribierten/translatierten hBRG1-Proteindomänen mit dem GST-E1A_{12S}-Wildtyp-Fusionsprotein (Abb. 11B) oder den GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinmutanten (Δ N/E1A_{12S}, Δ CR1/E1A_{12S} und Δ 1-79/E1A_{12S}; Abb. 11C) inkubiert. Wie aus den Abbildungen 11B und 11C ersichtlich, bindet sowohl die BRG1-HC- als auch die ATPase-Domäne an das E1A_{12S}-

Protein (GST-E1A_{12S}; Spur 3). Die BRG1-PR- und Bromo-Domäne zeigen keine nachweisbare Affinität zu dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* (Abb. 11B, Spur 3).

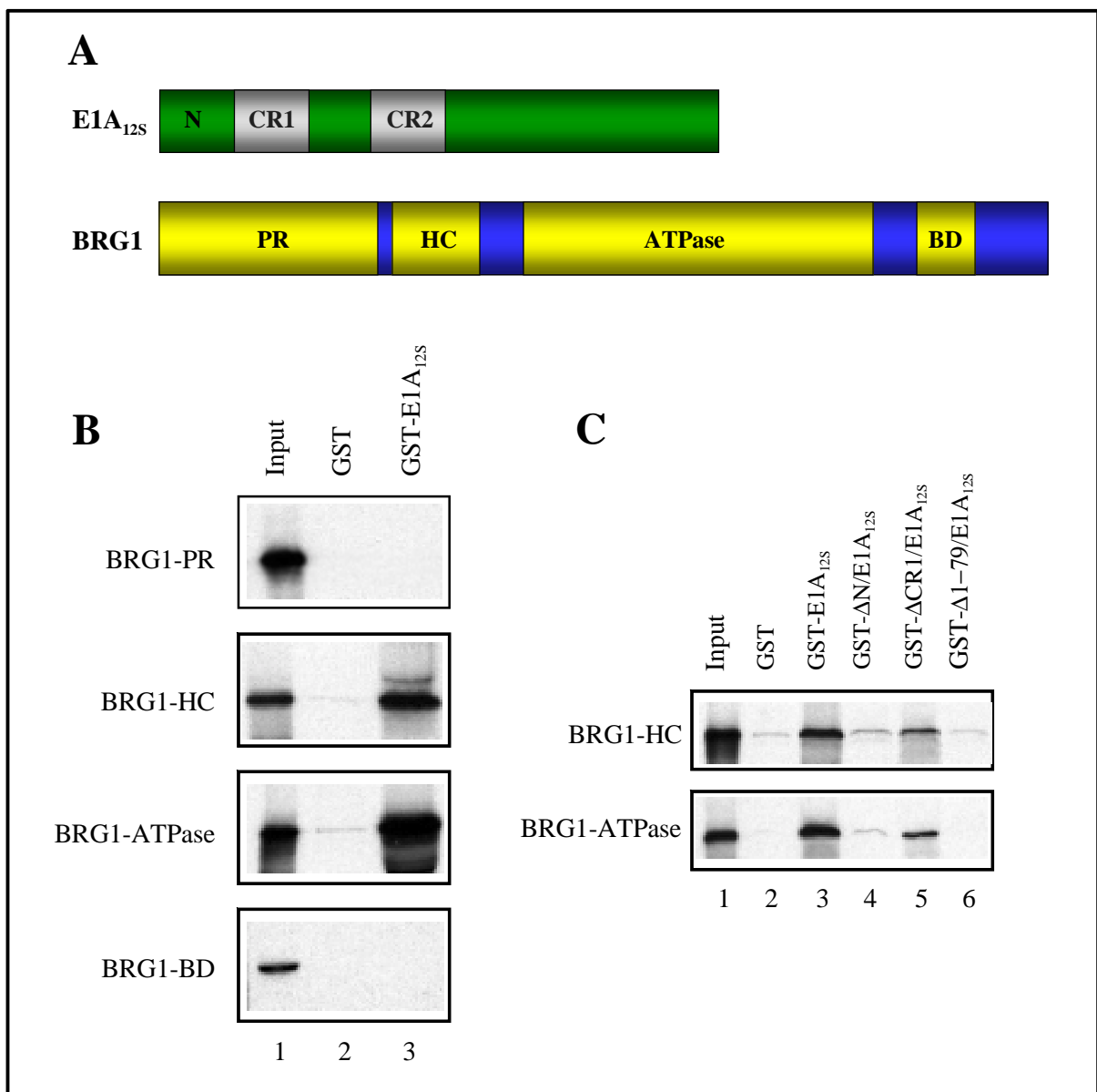


Abb. 11 Die Interaktion von hBRG1 und E1A_{12S}-Protein ist HC-, ATPase-Domäne sowie N-terminus und CR1 abhängig. **A.** Schematische Darstellung des E1A_{12S}-Proteins und hBRG1. Die grauen Rechtecke im E1A_{12S}-Protein stellen die konservierten Regionen 1 und 2 (CR1, CR2) dar. Die gelben Rechtecke im hBRG1 weisen auf die homologen Domänen [proline-rich (PR)-Domäne, highly charged (HC)-Domäne, ATPase-Domäne und bromodomain (BD)-Domäne] innerhalb der ATPase-Untereinheiten von SWI/SNF-Gruppe der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe auf. **B-C.** Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurden verschiedene *in vitro* translatierte, [³⁵S]-markierte hBRG1-Proteindomänen mit der GST-Proteindomäne (Spur 2 in B und C) oder verschiedenen GST-E1A_{12S}-Fusionsproteine wie angegeben (Spur 3 in B; Spuren 3 bis 6 in C) inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Spur 1 (in B und C) repräsentiert jeweils den Input von [³⁵S]-markierten hBRG1-Proteindomänen.

Die BRG1-HC- und die ATPase-Domäne binden interessanterweise an überlappenden, wenn nicht identischen Domänen, die N-terminale Domäne und die CR1-Domäne, des

E1A_{12S}-Proteins (GST-ΔN/E1A_{12S}, GST-ΔCR1/E1A_{12S}; Abb. 11C, Spur 4 und 5). Die Deletion der Aminosäuren 1-79 des E1A_{12S}-Proteins führte zu einem Verlust der Interaktion mit den hBRG1-Domänen (GST-Δ1-79/E1A_{12S}; Abb. 11C, Spur 6).

Kontrollexperimente belegten, dass vergleichbare Mengen an GST-Fusionsproteinen in den *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsanalysen eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten bestätigen, dass BRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* interagiert und dass für eine effiziente Interaktion die N-terminale Domäne und die CR1-Domäne des adenoviralen Proteins entscheidend sind. Zudem beweisen die hier durchgeführten Mutationsanalysen des hBRG1-Proteins, dass die BRG1-HC-Domäne und BRG1-ATPase-Domäne für die Interaktion mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* verantwortlich sind.

4.6 Die E1A_{12S}/hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors wird durch die Expression von hBRG1-Proteinmutanten inhibiert

Durch die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsanalysen *in vitro* wurde der Nachweis erbracht, dass hBRG1 in Abhängigkeit von der HC- und der ATPase-Domäne an das E1A_{12S}-Protein *in vitro* bindet (s. Kap. 4.4 und 4.5). Um zu untersuchen, welche der hBRG1-Proteindomänen für die E1A_{12S}/BRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors *in vivo* verantwortlich ist, wurden die klonierten hBRG1-Proteindomänen (s. Kap. 4.5) in sog. „*snell*-type“-Studien eingesetzt. Hierzu wurde in KB-Zellen in Gegenwart des E2_{Ad12}-Promotorkonstrukts, das E1A_{12S}-Protein und das hBRG1-Wildtyp-Protein jeweils mit verschiedenen hBRG1-Proteindomänen (hier als Myc-Epitop-Fusionsproteine) koexprimiert (Abb. 12A).

Wie in Abb. 12A dargestellt, führte die Koexpression der BRG1-PR-Domäne, die an das E1A_{12S}-Protein *in vitro* nicht bindet (Abb. 11B), nur zu einer geringen Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität. Die hBRG1-PR-Domäne hat keine signifikante Ähnlichkeit zu den bisher bekannten Proteinsequenzen (Papoulas *et al.*, 2001) und ihre Funktion ist bis heute nicht geklärt. Die Koexpression der BRG1-HC-Domäne oder der ATPase-Domäne bewirkte dagegen eine starke Reduktion (ATPase-Domäne) oder einen vollständigen Verlust (HC-Domäne) der hBRG1/E1A_{12S}-induzierten Expression des Reportergens E2_{Ad12}-CAT (Abb. 12A). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten aus den *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsanalysen, welche gezeigt haben, dass diese Domänen für die Bindung an das E1A_{12S}-Protein verantwortlich sind (Abb. 11B und 11C). In Übereinstimmung mit diesen

Ergebnissen zeigen die Daten anderer Arbeitsgruppen, dass sowohl die BRG1-HC-Domäne als auch die ATPase-Domäne für die transkriptionell aktivierende Funktion der SWI2/SNF2-Gruppe der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Faktoren eine entscheidende Rolle spielen (Johnston *et al.*, 1999).

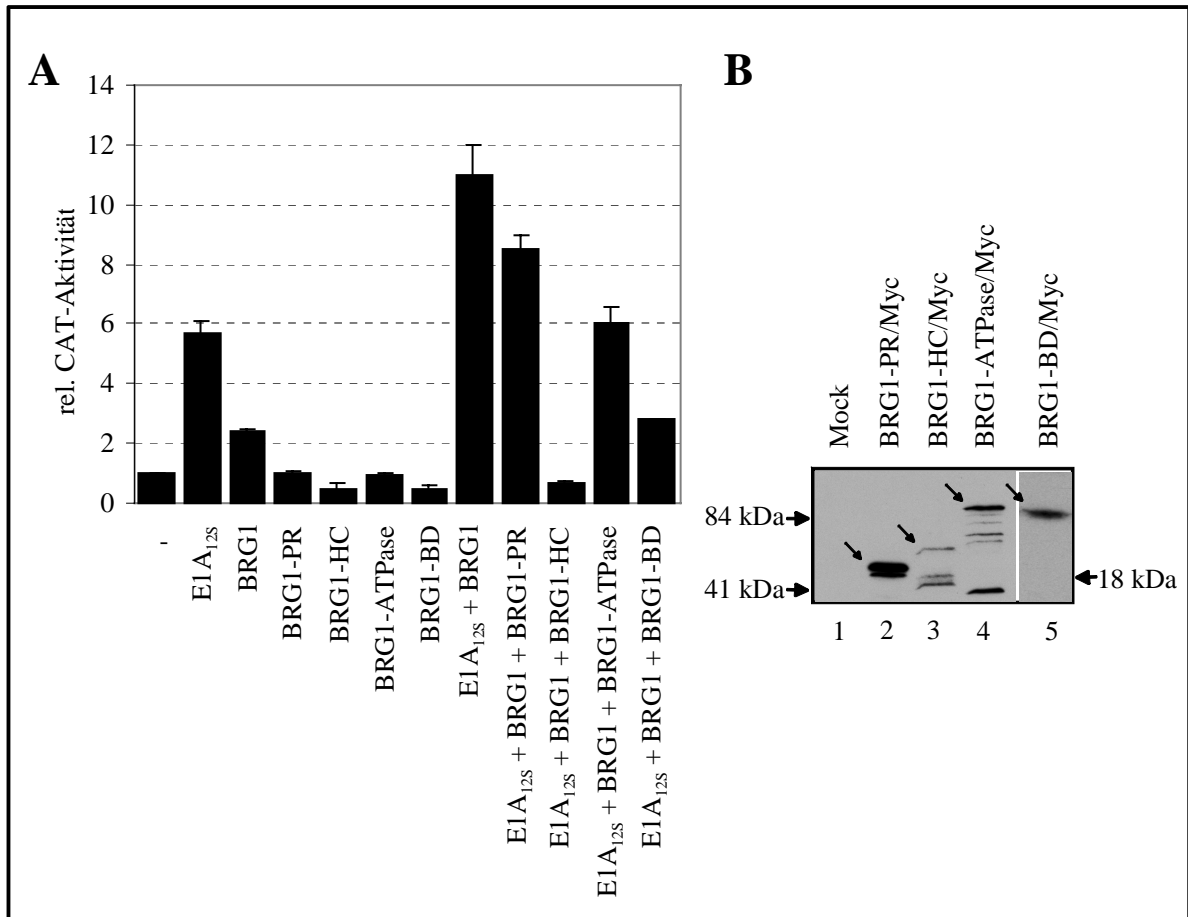


Abb. 12 Die HC-Domäne und die Bromodomäne des hBRG1-Proteins inhibieren die E1A_{12S}/hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. **A.** KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT, 1 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-Wildtyp, 1 µg pBJ5-hBRG1, 2 µg pcDNA-BRG1-PR, 2 µg pcDNA-BRG1-HC, 2 µg pcDNA-BRG1-ATPase und 2 µg pcDNA-BRG1-BD Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektoren konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pcDNA wurde als 1 normiert. **B.** Kontrolle der Expression der BRG1-Domänen, als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Myc-Epitop, in transfizierten Zellen. Gesamtzellextrakte aus KB-Zellen wurden mittels Western-Blot mit einem anti-Myc-Antikörper analysiert.

Interessanterweise verursachte die Koexpression der BRG1-Bromodomäne, die keine nachweisbare Affinität zu dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* aufweist (Abb. 11B), ebenfalls einen starken Verlust der hBRG1/E1A_{12S}-induzierten Aktivität des E2_{Ad12}-Promotors (Abb. 12A). Die Bromodomäne kommt in einer Vielzahl von in der Transkriptionsregulation beteiligten Proteinen, wie z. B. Histon-acetyltransferasen (HATs) und SWI2/SNF2-Gruppe der ATP-

abhängigen Chromatin-remodellierenden Faktoren, vor (Denis, 2001). Es wurde gezeigt, dass die Bromodomäne mit hoher Affinität an acetylierten Histonproteinen bindet (Owen *et al.*, 2000).

In transienten Expressionsanalysen, in denen nur die hBRG1-Proteindomänen in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins nicht aber des hBRG1-Wildtyp-Proteins koexprimiert wurden, wurden die gleichen Auswirkungen auf die E1A_{12S}/endogene-hBRG1-induzierte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Western-Blot-Analysen der für die transienten Expressionsanalysen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, dass die hBRG1-Proteindomänen in vergleichbaren Konzentrationen in den transfizierten KB-Zellen vorhanden waren (Abb. 12B), so dass ein Verlust oder eine Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität *in vivo* nicht auf unterschiedliche Mengen der hBRG1-Proteindomänen in den transfizierten Zellen zurückzuführen ist. Die hier durchgeführten „squelching-type“-Studien mit verschiedenen hBRG1-Proteindomänen deuten darauf hin, dass bei der E1A_{12S}/hBRG1-induzierten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors der sog. „Highly-Charged“ Region und der Bromodomäne des hBRG1-Proteins eine entscheidende Rolle zukommt.

4.7 Die ATPase-Untereinheit BRG1 der hSWI/SNF-Komplexe interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein *in vivo*

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass hBRG1 mit dem E1A_{12S}-Protein interagiert und dass diese Interaktion zu der E1A_{12S}/hBRG1-induzierten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors entscheidend beiträgt. Als nächstes sollte daher geklärt werden, ob die native hBRG1-Untereinheit und das E1A_{12S}-Protein auch *in vivo* interagieren.

Zu diesem Zweck wurden in KB-Zellen durch Transfektion der entsprechenden Vektoren, das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder die $\Delta 1-79$ /E1A_{12S}-Proteinmutante (als Myc-Epitop gekoppelte Fusionsproteine) transient exprimiert. Die Immunpräzipitationen wurden mit einem gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörper (Abb. 13A) oder einem anti-hBRG1 spezifischen Antiserum (Abb. 13B; Schnitzler *et al.*, 1998) durchgeführt (s. Kap. 3.17). Gebildete Immunkomplexe wurden anschließend im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen hBRG1, hBRM und In1 (eine von den BRG1-assoziierten Faktoren; Abb. 13A) oder einem anti-Ad12 E1A-Antiserum (Abb. 13B) analysiert.

Wie in Abb. 13A dargestellt, wurde das hBRG1-Protein mit dem gegen das Myc-Epitop der E1A_{12S}-Fusionsproteine gerichteten Antikörper kopräzipitiert (Abb. 13A, Spur 3, obere Darstellung). Im Gegensatz hierzu führte die Deletion der Aminosäuren 1-79 (Δ 1-79/E1A_{12S}/Myc) zu einem Verlust des Bindungspotentials des E1A_{12S}-Mutantenproteins an die ATPase-Untereinheit des hSWI/SNF-Komplexes (Abb. 13A, Spur 4, obere Darstellung), so dass BRG1 nicht kopräzipitiert werden konnte.

Die Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und hBRG1 und die entscheidende Rolle der Aminosäuren 1-79 des E1A_{12S}-Proteins bei dieser Interaktion *in vivo* wurde durch die Kopräzipitation des adenoviralen Wildtyp-Proteins, mit einem anti-hBRG1 spezifischen Antiserum aus Kernextrakten der transfizierten KB-Zellen, zusätzlich bestätigt (Abb. 13B, Spuren 3 und 4). Keine hBRG1- oder E1A_{12S}-spezifischen Signale (Präzipitationen) waren in Immunkomplexen aus Kontroll-transfizierten Zellen nachzuweisen (Abb. 13A und 13B, Spur 2).

Wie im Kap. 1.7 beschrieben, sind in humanen Zellen bisher zwei ySWI2/SNF2-ähnliche Proteine, BRM und BRG1, identifiziert worden. Diese ATPase-Untereinheiten kommen in unterschiedlichen hSWI/SNF-Komplexe vor (Nie *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob das E1A_{12S}-Protein mit anderen hSWI/SNF-Komplexen, welche hBRM als ATPase-Untereinheit beinhalten, interagiert, wurden die gebildeten Immunkomplexe nach der Präzipitation mit einem gegen das myc-Epitop der E1A_{12S}-Fusionsproteine gerichteten Antikörper im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen hBRM analysiert. Wie in Abb. 13A (mittlere Darstellung) gezeigt, kam es weder in Anwesenheit des E1A_{12S}-Wildtyp-Proteins noch des Δ 1-79/E1A_{12S}-Proteins zu einer nachweisbaren Anreicherung der hBRM-Untereinheit (Abb. 13A, Spuren 3 und 4). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Daten aus den transienten Expressionsanalysen, in denen die Koexpression der hBRM-Untereinheit keine Änderung der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bewirkte (Abb. 7B).

Die hSWI/SNF-Komplexe sind große Multimere von ca. 11 Proteinuntereinheiten (Wang *et al.*, 1996; Martens und Winston, 2003). Einige dieser Untereinheiten kommen in verschiedenen hSWI/SNF-Komplexen vor (Phelan *et al.*, 2000; Katsani *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob andere BAFs (BRG1 associated factors) mit dem Transkriptionsfaktorkomplex, bestehend aus E1A_{12S} und BRG1 *in vivo* assoziiert vorliegen, wurden die gebildeten Immunkomplexe nach der Präzipitation mit dem gegen das Myc-

Epitop der E1A_{12S}-Fusionsproteine gerichteten Antikörper, im Western-Blot mit einem anti-Ini1 spezifischen Antikörper analysiert. Interessanterweise zeigte die E1A_{12S}-Proteinmutante (Δ 1-79/E1A_{12S}), die zur Interaktion mit hBRG1 *in vivo* nicht mehr in der Lage war, auch keine nachweisbare Affinität zu Ini1 (Abb. 13A, Spur 4, untere Darstellung). Im Gegensatz dazu wurde die Ini1-Untereinheit mit dem gegen das Myc-Epitop des E1A_{12S}-Wildtyp-Fusionsproteins gerichteten Antikörper kopräzipitiert (Abb. 13A, Spur 3, untere Darstellung).

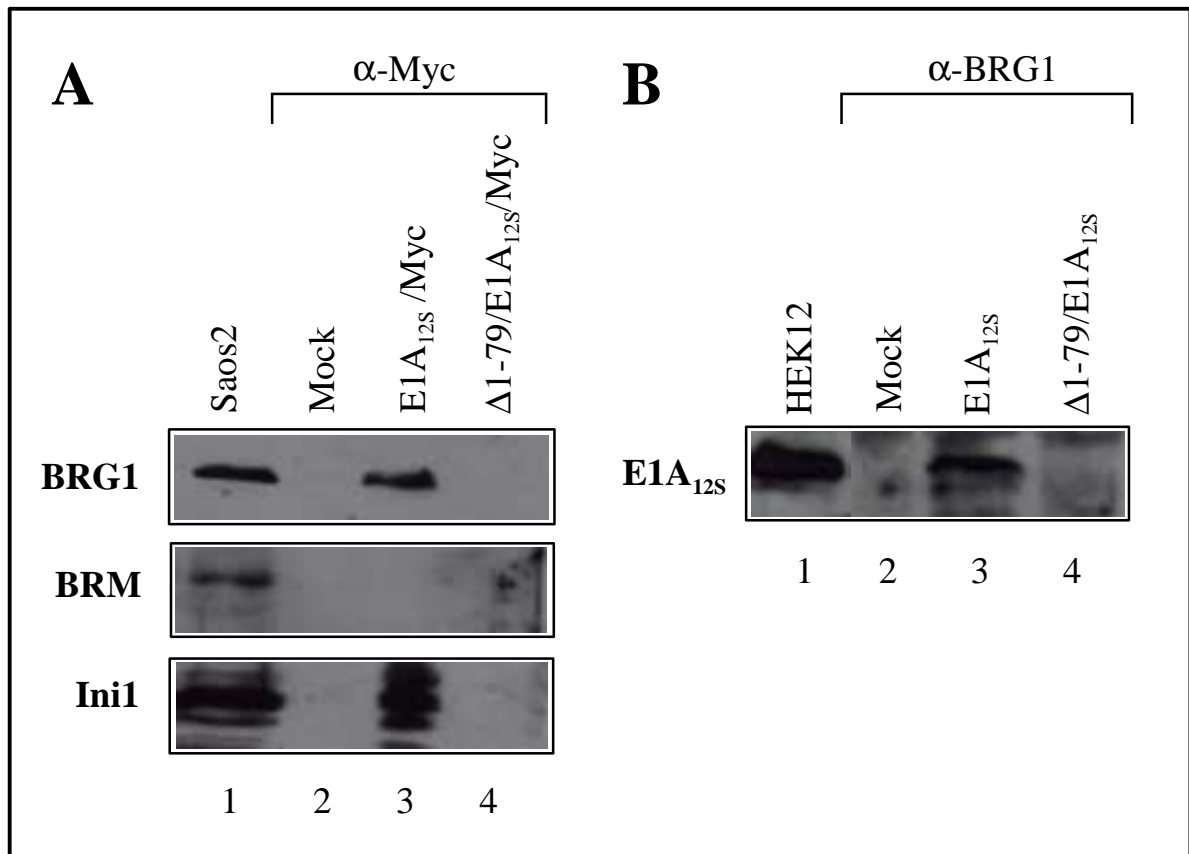


Abb. 13 hBRG1 interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein *in vivo*. KB-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder das Δ 1-79/E1A_{12S}-Proteinmutante (**A**, als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Myc-Epitop) oder dem entsprechenden Leervektor wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später lysiert und die Kernextrakte mit einem anti-Myc-Antikörper (**A**) oder einem anti-hBRG1-Antiserum (**B**) inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit den links angegebenen Antikörpern analysiert. Als Western-Blot-Kontrolle wurde in der Spur 1 Gesamtzellextrakt aus Saos2-Zellen (**A**) oder einer Ad12 E1-transformierten Zelllinie (HEK12, Whittaker *et al.*, 1984; **B**) aufgetragen.

Identische Ergebnisse wurden für die *in vivo* Interaktionen der BAF57 und BAF155 Untereinheiten mit dem E1A_{12S}-Protein in Western-Blot Analysen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten anderer Arbeitsgruppen und deuten darauf hin, dass die ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe *in vivo* mit einer Reihe von BAFs assoziiert vorliegen (Sif *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Kernextrakte bestätigten, dass das E1A_{12S}-Protein und die E1A_{12S}-Proteinmutante in vergleichbaren Konzentrationen in den transfizierten KB-Zellen vorhanden waren (Daten nicht gezeigt), so dass ein Verlust der Interaktion zwischen hSWI/SNF-Untereinheiten und dem E1A_{12S}-Protein *in vivo* nicht auf Unterschiede in der Proteinkonzentration der E1A_{12S}-Proteine in den Zellen zurückzuführen ist. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass das E1A_{12S}-Protein nur dann mit ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen *in vivo* interagiert, wenn diese BRG1 als die ATPase-Untereinheit enthalten. Ein Vergleich der transienten Expressionsanalysen mit den Protein-Protein-Interaktionsanalysen *in vitro* und *in vivo* belegt, dass diese Interaktion entscheidend zu der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors *in vivo* beiträgt.

4.8 hBRG1 ist an der PKA-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt

Eine Voraussetzung für die Aktivierung cAMP-induzierbarer Gene durch den cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg ist die spezifische Phosphorylierung der CRE-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 durch die katalytische Untereinheit (C-Untereinheit) des PKA-Holoenzym (Hagiwara *et al.*, 1993). Die PKA-vermittelte Serinphosphorylierung von CREB-1/ATF-1 ermöglicht die Rekrutierung der zellulären Koaktivatoren CBP/p300, die für die Aktivierung cAMP/PKA-abhängiger Promotoren entscheidend sind (Mayr *et al.*, 2001).

Da der E2_{Ad12}-Promotor über das E2-CRE reguliert wird, an welches die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 binden (s. Kap. 1.8 und 4.1), kann die Expression des E2_{Ad12}-Promotors durch die PKA-C-Untereinheit vermittelte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 aktiviert werden. Um zu untersuchen, ob die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Faktoren zu der PKA-induzierten Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors beitragen, wurde in Anwesenheit des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT die katalytische Untereinheit C α der PKA (PKA-C α), hBRG1 oder hBRM in KB-Zellen transient koexprimiert. Wie in Abb. 14 dargestellt, war ohne die PKA-C α -Untereinheit keine der eingesetzten ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Die Expression der katalytischen Untereinheit C α der PKA ergab eine 6-fache

Aktivierung des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT (Abb. 14). Die Koexpression von hBRG1 bewirkte eine 24,3-fach erhöhte Aktivierung der Expression des Reportergens (Abb. 14). Im Vergleich dazu führte die Koexpression von hBRM nur zu einer 10-fachen Aktivierung des Reporterkonstrukts (Abb. 14).

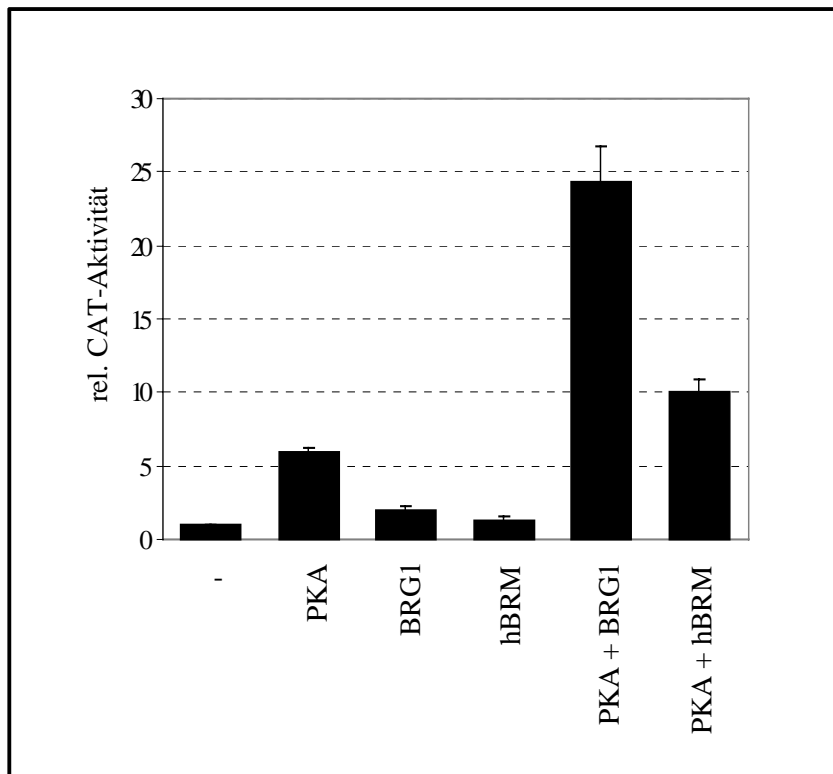


Abb. 14 hBRG1 ist bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA-C α) beteiligt. KB-Zellen wurden mit je 1 μ g des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und RSV-CHO-PKA-C α , pCG-hBRM und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor pRc/RSV konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe in einem PKA-abhängigen Signalweg zur Aktivierung der Expression CREB-abhängiger Gene beitragen. Obwohl die PKA-induzierte Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors durch die Koexpression der beiden ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe erhöht wird, kommt der hBRM-Untereinheit hierbei nur eine untergeordnete Rolle zu (Abb. 14). Zusammenfassend kann aus den hier durchgeführten transienten Expressionsanalysen geschlossen werden, dass vor allem die hBRG1 als ATPase-Untereinheit enthaltenden hSWI/SNF-Komplexe entscheidend zu der PKA-induzierten Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen beitragen. In diesen Zellen

kann die Funktion von hBRG1 nicht durch hBRM ersetzt werden. Zudem wurde durch diese Daten der erste Beweis für eine Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der PKA-vermittelte Aktivierung von CREB-abhängigen Promotoren erbracht.

4.9 Die ATPase-Untereinheiten BRG1 und BRM der hSWI/SNF-Komplexe tragen zu der PKA-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in hBRG1- und hBRM-defizienten Zelllinien bei

Zur weiteren Analyse bezüglich der Rolle der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden SWI/SNF-Komplexen bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors, wurden transiente Expressionsstudien in SW13- und C33A-Zellen, welche einen kaum nachweisbaren Level an endogenem BRG1 bzw. BRM aufweisen, vorgenommen.

Die Kotransfektion des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT mit einem Expressionsvektor, der die katalytische PKA Untereinheit C α exprimiert, führte in SW13-Zellen zu einer 2,5-fachen Aktivierung der Expression des Reportergens (Abb. 15). Die Koexpression von hBRG1 führte zu einer 10,5-fach erhöhten Aktivierung der Expression des Reportergens (Abb. 15). Interessanterweise führte auch die Koexpression von hBRM in diesen Zellen zu einer stark erhöhten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors (13,5-fach; Abb. 15). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten der Arbeitsgruppe von Knudsen, die gezeigt haben, dass die Funktion von hBRG1 in SW13-Zellen durch hBRM kompensiert werden kann (Strobeck *et al.*, 2002).

Überraschenderweise bewirkte die Koexpression des E1A_{12S}-Proteins mit den ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexen in SW13-Zellen sowie in C33A-Zellen nur eine geringfügig erhöhte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors (Daten nicht gezeigt). Western-Blot-Analysen der für die transienten Expressionsanalysen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, dass eine Reduktion der hBRG1-bewirkten E2_{Ad12}-Promotoraktivierung nicht auf eine ineffektive Expression des E1A_{12S}-Proteins in den transfizierten Zellen zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigen die Chromatin-Immunpräzipitation-Analysen, dass es in C33A-Zellen zu einer E1A_{12S}-induzierten Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt (s. Kap. 4.10, Abb. 16B). Hierdurch kann die Unfähigkeit von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor zu assoziieren, als einen möglichen Grund für die geringe E1A_{12S}/BRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors, ausgeschlossen werden.

Die Unfähigkeit des E1A_{12S}-Proteins in Abhängigkeit von ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe den E2_{Ad12}-Promotor in BRG1- bzw. BRM-defizienten Zelllinien zu aktivieren, kann möglicherweise in diesen Zellen auf das Fehlen oder einen Funktionsverlust von Faktoren, die in die E1A_{12S}-SWI/SNF-induzierte Aktivierung des adenoviralen Promotors involviert sind, zurückzuführen sein. Hierfür sprechen auch die Daten anderer Arbeitsgruppen, die zeigen, dass in diesen Zellen die stark verminderte oder fehlende Expression einer Vielzahl von hSWI/SNF-abhängigen Genen durch eine ectopische Expression von BRG1 nur zum Teil wiederhergestellt werden kann (Liu *et al.*, 2001; Reisman *et al.*, 2002).

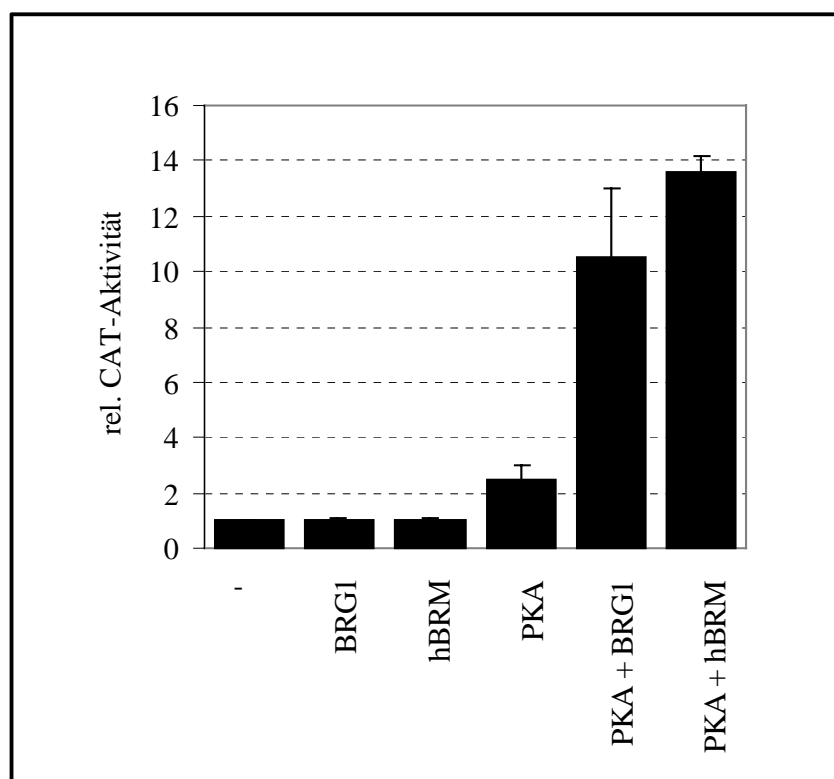


Abb. 15 In hBRG1- und hBRM-defizienten Zelllinien tragen beide ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe zur PKA-C α -vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bei. SW13-Zellen wurden mit je 1 μ g des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und RSV-CHO-PKA-C α , pCG-hBRM und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor pRc/RSV konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionseende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Eine weitere Möglichkeit für die Unfähigkeit des E1A_{12S}-Proteins in Abhängigkeit von ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe in diesen Zelllinien den E2_{Ad12}-Promotor zu aktivieren, könnte im Fehlen oder einer verringerten Expression von anderen Untereinheiten der SWI/SNF-Komplexe, die in der E1A_{12S}/BRG1-vermittelten Aktivierung

des Promotors eine Rolle spielen, liegen. Obwohl in diesen Zelllinien außer BRG1 und BRM alle andere hSWI/SNF-Untereinheiten vorhanden sind, wurde eine verminderte Expression einiger dieser Untereinheiten nachgewiesen (DeCristofaro *et al.*, 2001). Es konnte weiterhin in den SW13-Zellen gezeigt werden, dass es zwar zur Assoziierung der Untereinheiten und zur Bildung von SWI/SNF-Komplexen kommt, diese Komplexe jedoch durch das Fehlen einiger Untereinheiten nicht vollständig sind (Rando *et al.*, 2002).

Da die Koexpression der katalytische PKA-Untereinheit C α mit den ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe, BRG1 und BRM, in SW13-Zellen eine stark erhöhte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bewirkt (Abb. 15), kann davon ausgegangen werden, dass für die PKA-SWI/SNF-vermittelte Aktivierung die Anwesenheit von Faktoren, die für die E1A_{12S}-SWI/SNF-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in diesen Zellen notwendig sind, nicht erforderlich ist, oder dass durch den PKA-vermittelten Aktivierungsmechanismus die Funktion dieser Faktoren ersetzt bzw. wieder hergestellt werden kann.

4.10 hBRG1 assoziiert an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo*

Die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe sind durch die Funktion ihrer ATPase-Untereinheiten in der Lage die Energie von ATP-Hydrolyse zur Destabilisierung von DNA/Histon Interaktionen zu verwenden. Diese ATP-abhängigen Änderungen in der Chromatinstruktur bewirken eine erhöhte DNA-Zugänglichkeit und erleichtern die Interaktion anderer an dem Transkriptionsprozess beteiligter Proteine mit der DNA. (Kingston und Narlikar, 1999; Becker und Hörz, 2002).

Da die Ergebnisse der transienten Expressionsanalysen in KB-Zellen den Nachweis erbracht haben, dass hBRG1 an der Aktivierung der Transkription des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors beteiligt ist (s. Kap.4.2 und 4.8), wurde untersucht, ob es im Verlauf der Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors *in vivo* zu einer Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt und welche Rolle dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein hierbei zukommt. Diese Fragestellungen wurden durch Chromatin-Immunpräzipitationen (CHIP) analysiert. Weiterhin sollte in diesen Studien geklärt werden, ob es in BRG1- bzw. BRM-defizienten Zelllinien, in denen die Koexpression des E1A_{12S}- und des BRG1-Proteins nur zu

einer geringfügig erhöhten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors geführt hat (s. Kap. 4.9), zu einer Assoziierung von BRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt.

Hierzu wurde das E2_{Ad12}-Reporterkonstrukt mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein und/oder hBRG1 in KB-Zellen bzw. C33A-Zellen kotransfiziert und mit einem gegen hBRG1 gerichteten Antiserum immunpräzipitiert (s. Kap. 3.18.1). Die präzipitierte E2_{Ad12}-Promotor-DNA wurde anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor über PCR detektiert.

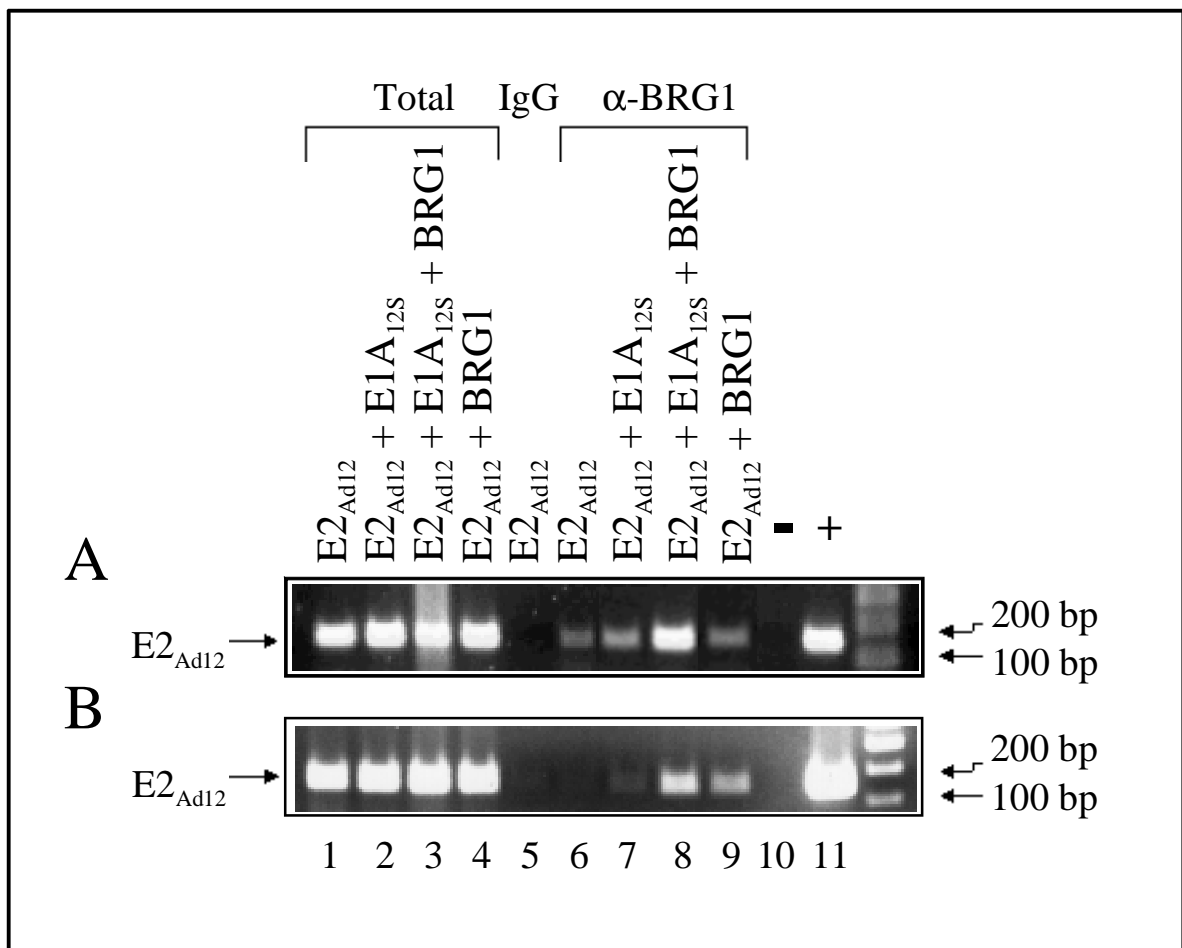


Abb. 16 Der E2_{Ad12}-Promotor ist mit hBRG1 *in vivo* assoziiert. KB-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT und pRc/RSV-E1A_{12S} und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. 40 h nach Transfektionsbeginn wurde die DNA präpariert, ultraschallbehandelt, mit einem anti-hBRG1-Antiserum (Spuren 6 bis 9) oder Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen IgG, Spur 5) immunpräzipitiert und durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor analysiert. Aliquots der ultraschallbehandelten DNA wurden vor der Immunpräzipitation analysiert (Total; Spuren 1 bis 4). Die Position der E2_{Ad12}-Promotorfragmente ist links, der Molekulargewichtstandard rechts angegeben. Die Spuren 10 und 11 zeigen die PCR-Kontrollen.

Wie aus Abb. 16 ersichtlich, bindet ectopisch exprimiertes BRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* (Abb. 16A und 16B, Spur 9). Die Koexpression des E1A_{12S}-Proteins führte

allerdings zu einem starken Anstieg der Anzahl an präzipitierten E2_{Ad12}-Promotorfragmenten (Abb. 16A und 16B, Spur 8). Auch die Expression des E1A_{12S}-Proteins allein bewirkte in beiden Zelllinien die Assoziierung des endogenen BRG1-Proteins an den E2_{Ad12}-Promotor (Abb. 16A und 16B, Spur 7). Da ein Kontroll-Antikörper nicht zu einer Präzipitation des E2_{Ad12}-Promotors führte (Abb. 16A und 16B, Spuren 5 und 6), wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, dass hBRG1 mit dem adenoviralen E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* assoziiert ist, und dass das E1A_{12S}-Protein, zumindest teilweise, für die Rekrutierung der ATPase-Untereinheit des hSWI/SNF-Komplexes BRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor verantwortlich ist. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse der Abb. 16B, dass es auch in den C33A-Zellen zu einer Assoziierung der BRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass die geringe E1A_{12S}/BRG1-vermittelte E2_{Ad12}-Promotoraktivierung in BRG1-defizienten Zellen auf die nicht vorhandene BRG1-Bindung an den Promotor zurückzuführen ist.

Um zu untersuchen, ob es in einem PKA-abhängigen Signalweg auch zur Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt, wurden ebenfalls CHIP-Analysen in KB-Zellen mit dem E2_{Ad12}-Reporterkonstrukt und Expressionsvektoren für die katalytische Untereinheit C α der PKA und/oder hBRG1 durchgeführt. Wie in Abb. 17 gezeigt, führte der Einsatz eines Kontroll-Antikörpers nicht zu einer Präzipitation des E2_{Ad12}-Promotors (Spur 5). Die Expression der PKA C α -Untereinheit bewirkte eine effiziente Bindung von endogenen BRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor (Abb. 17, Spur 7). Während die Überexpression von BRG1 allein zu einer, wenn auch schwachen, Präzipitation der E2_{Ad12}-Promotorfragmente führte (Abb. 17, Spur 8), wurde nach der Koexpression der PKA C α -Untereinheit und hBRG1 ein starker Anstieg der Menge an präzipitierten E2_{Ad12}-Promotorfragmenten detektiert (Abb. 17, Spur 9). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus den transienten Expressionsanalysen (s. Kap. 4.8), welche die Beteiligung ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender hSWI/SNF-Komplexe an der PKA-vermittelten Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors gezeigt haben. Die Daten der CHIP-Analysen zeigen weiterhin, dass es in einem PKA-abhängigen Signalweg zu einer Rekrutierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt.

Um erste Hinweise auf einen Rekrutierungsmechanismus der hBRG1-Untereinheit an den E2_{Ad12}-Promotor zu erhalten, wurden CHIP-Analysen in KB-Zellen mit dem E2_{Ad12}-CAT Reporterkonstrukt oder der Promotormutante E2_{Ad12} Δ CRE-CAT, bei der das E2-CRE-Promotorelement deletiert wurde, und Expressionsvektoren für hBRG1, das E1A_{12S}-Protein

bzw. die $\Delta 1-79/E1A_{12S}$ -Proteinmutante durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob der N-Terminus und die CR1-Domäne des $E1A_{12S}$ -Proteins, welche für die Bindung des $E1A_{12S}$ -Proteins an hBRG1 *in vitro* und *in vivo* verantwortlich sind (s. Kap. 4.4 und 4.7), bei der Rekrutierung von hBRG1 an den $E2_{Ad12}$ -Promotor *in vivo* eine Rolle spielen. Zudem sollte in diesen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Assoziierung von hBRG1 an den $E2_{Ad12}$ -Promotor vom Vorhandensein des E2-CRE-Promotorelements abhängig ist.

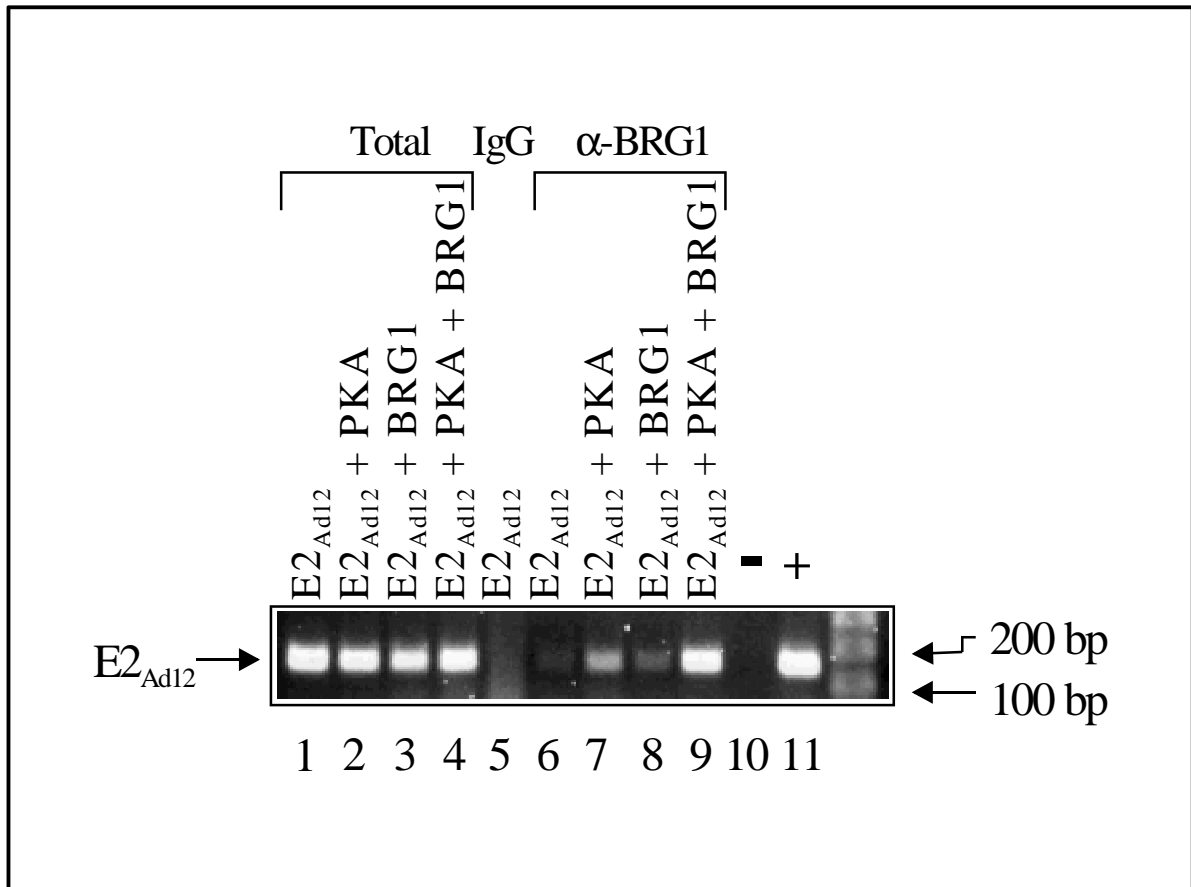


Abb. 17 Die katalytische Untereinheit $C\alpha$ der PKA bewirkt die Bindung von hBRG1 an den $E2_{Ad12}$ -Promotor *in vivo*. KB-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt $E2_{Ad12}$ -CAT und pRc/RSV- $E1A_{12S}$ (A), RSV-CHO-PKA- $C\alpha$ (B) und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. 40 h nach Transfektionsbeginn wurde die DNA präpariert, ultraschallbehandelt, mit einem anti-hBRG1-Antiserum (Spuren 6 bis 9) oder Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen IgG, Spur 5) immunpräzipitiert und durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den $E2_{Ad12}$ -Promotor analysiert. Aliquots der ultraschallbehandelten DNA wurden vor der Immunpräzipitation analysiert (Total; Spuren 1 bis 4). Die Position der $E2_{Ad12}$ -Promotorfragmente ist links, der Molekulargewichtstandard rechts angegeben. Die Spuren 10 und 11 zeigen die PCR-Kontrollen.

Wie in Abb. 18 dargestellt, führte die Koexpression des $E1A_{12S}$ -Wildtyp-Proteins und BRG1 erwartungsgemäß zu der Präzipitation des $E2_{Ad12}$ -Promotors (Abb. 18, Spur 5 und s. Abb. 16A). Bei der Koexpression der $\Delta 1-79/E1A_{12S}$ -Proteinmutante und hBRG1 wurde nur ein sehr schwaches $E2_{Ad12}$ -Promotorsignal detektiert (Abb. 18, vgl. Spuren 5 und 7). Die

Promotormutante E2_{Ad12}ΔCRE-CAT konnte in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins und hBRG1 mit dem anti-hBRG1 gerichteten Antiserum nicht präzipitiert werden (Abb. 18, Spur 6).

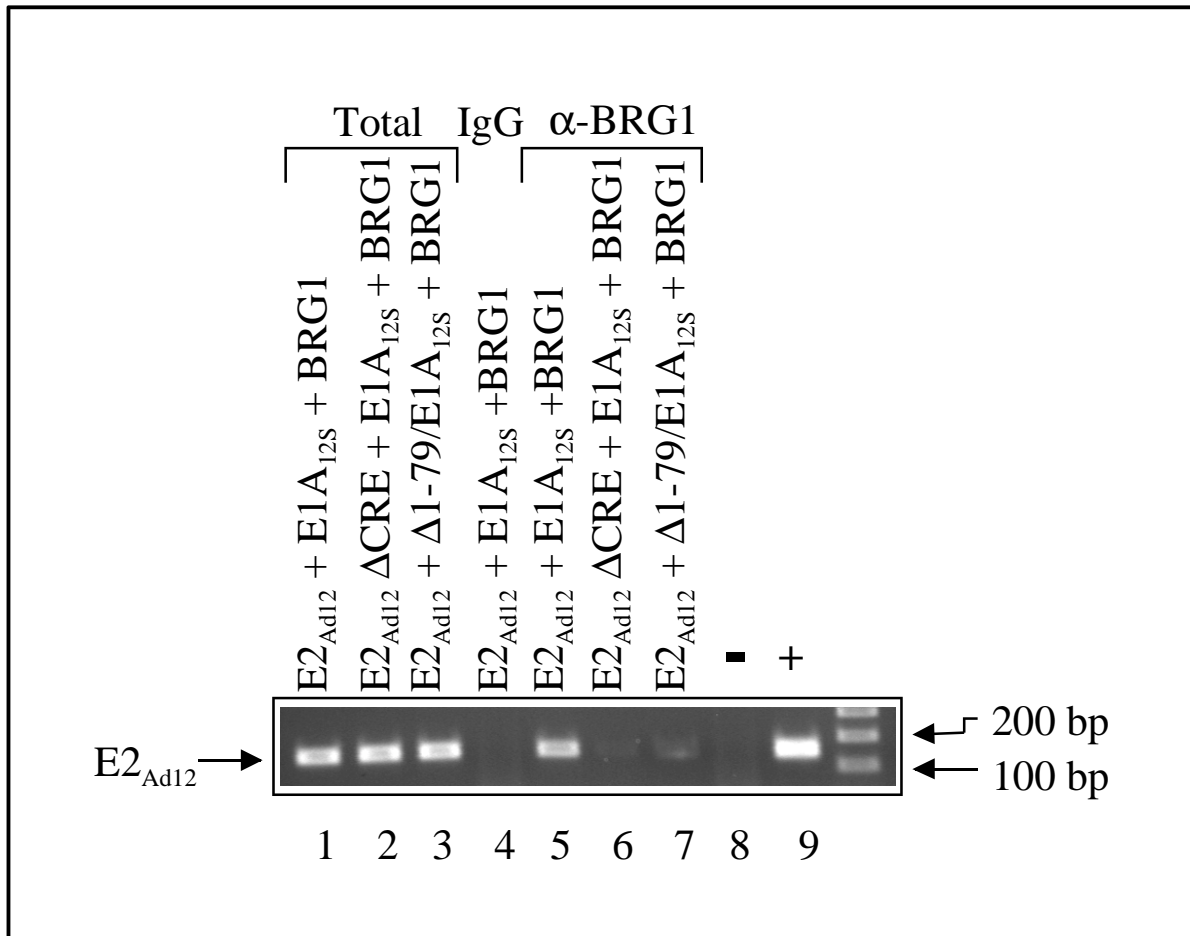


Abb. 18 Die Assoziierung von hBRG1 mit dem E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* ist von E2-CRE sowie vom N-Terminus und der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins abhängig. KB-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT (Spuren 1, 3, 4, 5 und 7) oder mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}ΔCRE-CAT (Spuren 2 und 6) und pRc/RSV-E1A_{12S} oder pRc/RSV-Δ1-79/E1A_{12S} und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. 40 h nach Transfektionsbeginn wurde die DNA präpariert, ultraschallbehandelt, mit einem anti-hBRG1-Antiserum (Spuren 5 bis 7) oder Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen IgG, Spur 4) immunpräzipitiert und durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor analysiert. Aliquots der ultraschallbehandelten DNA wurden vor der Immunpräzipitation analysiert (Total; Spuren 1, 2 und 3). Die Position der E2_{Ad12}-Promotorfragmente ist links, der Molekulargewichtstandard rechts angegeben. Die Spuren 8 und 9 zeigen die PCR-Kontrollen.

Diese Experimente zeigen, dass der transkriptionsinaktive Promotor nicht mit hBRG1 assoziiert ist, möglicherweise bedingt durch das Fehlen der Bildung des Transaktivatorkomplexes bestehend aus CREB-1/ATF-1, dem E1A_{12S}-Protein und den Acetylasen p300/CBP. Weiterhin beweisen diese Daten, dass der N-Terminus und die CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins, welche für die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors essentiell sind (Moran, 1994; Lipinski *et al.*, 1999), auch bei der Rekrutierung von

hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* von entscheidender Bedeutung sind (Abb. 18, vgl. Spuren 5 und 7).

4.11 Die Histondeacetylase-1 inhibiert die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors

Die intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität der Koaktivatoren CBP/p300 ist für die Aktivierung der Transkription CRE-regulierter Promotoren von entscheidender Bedeutung (Korzus *et al.*, 1998). Zahlreiche Studien haben demonstriert, dass das E1A_{12S}-Protein mit den zellulären Koaktivatoren CBP/p300 interagiert und dass diese Interaktion zur Aktivierung der Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität von CBP/p300 führt (Bannister und Kouzarides 1996; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Daten aus unserer Arbeitsgruppe belegen, dass dem CBP/p300-vermittelten Acetylierungsprozess von Histonproteinen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors zukommt und dass die Histondeacetylase-1 (HDAC1) die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors weitgehend reprimiert (Fax *et al.*, 2000).

Sowohl die Histonacetyltransferasen, als auch die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexe, tragen durch die Destabilisierung der repressiv wirkenden nukleosomalen Struktur zur Aktivierung der Transkription bei (Fyodorov und Kadonaga, 2001; Peterson, 2002). Da meine Daten beweisen, dass die Funktion von hBRG1 für die Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors entscheidend ist, sollte untersucht werden, ob die Überexpression von hBRG1 den Effekt von Histondeacetylase-1 zu kompensieren vermag und ob zwischen der E1A_{12S}/hBRG1-induzierten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors und dem CBP/p300-vermittelten Acetylierungsprozess der Histonproteine eine Verbindung besteht.

Hierzu wurde in transienten Expressionsanalysen in KB-Zellen, die das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT enthielten, in Ab- oder Anwesenheit von Histondeacetylase-1 das E1A_{12S}-Protein und/oder hBRG1 exprimiert. Wie in Abb. 19A dargestellt, führte erwartungsgemäß die Koexpression des E1A_{12S}-Proteins und HDAC1 zu einer Reduzierung der Aktivität des Reportergens (Fax *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde auch die E1A_{12S}/hBRG1-induzierte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch Kotransfektion von HDAC1 stark reprimiert (Abb. 19A). Hierbei konnte durch die Überexpression von hBRG1 keine erhöhte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beobachtet werden (Abb. 19A ; vgl.

E1A_{12S}/HDAC1 und E1A_{12S}/BRG1/HDAC1). Dass die Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität durch die HDAC1 nicht auf eine verminderte Expression des E1A_{12S}-Proteins oder hBRG1 in den transfizierten Zellen zurückzuführen war, wurde durch Western-Blot-Analysen der für die transienten Expressionsanalysen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Daten kann angenommen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung durch CBP/p300 und der hBRG1-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors besteht.

In weiteren Experimenten gleicher Art wurde der Einfluß von HDAC1 auf die PKA/BRG1-induzierte E2_{Ad12}-Promotoraktivierung untersucht. Wie in Abb. 19B dargestellt, führte die Koexpression der HDAC1 zu der Reduktion der PKA-induzierten Expression des Reportergens. Auch die PKA/hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors wurde in Anwesenheit von HDAC1 stark reprimiert (Abb. 19B).

In diesen Experimenten, sowohl in Anwesenheit der katalytische Untereinheit C α der PKA als auch des E1A_{12S}-Proteins, konnte der HDAC1-bewirkten Repression des E2_{Ad12}-Promotors durch eine Erhöhung der Konzentration von ectopisch-exprimierten hBRG1 nicht entgegengewirkt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse beweisen, dass ein Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung und der Funktion von hSWI/SNF-Komplexen bei der Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors besteht. Diesen Daten zur Folge ist die Fähigkeit der hBRG1-Untereinheit zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors von der Acetylierung der Histonproteinen durch den zellulären Koaktivatoren CBP/p300 abhängig.

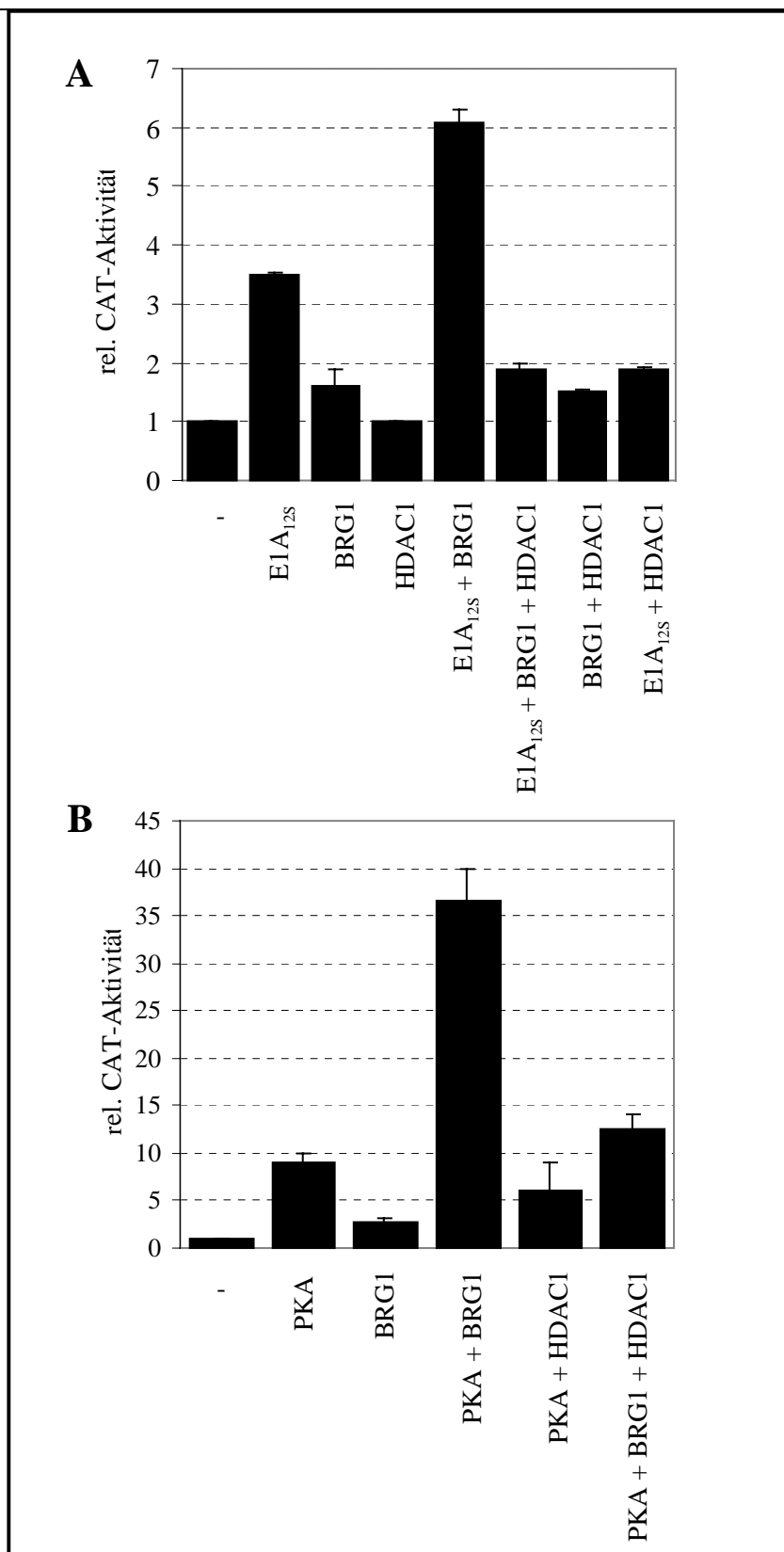


Abb. 19 Die Histondeacetylase HDAC1 reprimiert die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und je 1 µg pRc/RSV-E1A_{12S} (A), RSV-CHO-PKA-Cα (B), pCMV-HA-HDAC1 und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren wie angegeben transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit der Leervektoren wurde als 1 normiert.

4.12 Die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor wird durch die Aktivität des CBP-Inhibitors Roscovitine und die Histondeacetylase-1 inhibiert

In transienten Expressionsanalysen wurde der Nachweis erbracht, dass die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors von der Acetylierung der Histonproteine abhängig ist und durch die Koexpression von Histondeacetylase-1 stark reprimiert werden kann (s. Kap. 4.11). Nun stellte sich die Frage, ob die Acetylierung von Histonproteinen für die Rekrutierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* von Bedeutung ist. Diese Fragestellung wurde durch Chromatin-Immunpräzipitationen (CHIP) analysiert. Hierzu wurde das E2_{Ad12}-Reporterkonstrukt mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein, hBRG1 und/oder HDAC1 in KB-Zellen kotransfiziert. Anschließend wurden die Promotor-DNA-Proteinkomplexe mit einem gegen hBRG1 gerichteten Antiserum oder mit einem anti-Acetyl Histon H4-Antiserum immunpräzipitiert und die präzipitierten E2_{Ad12}-Promotor-Sequenzen mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor über PCR detektiert.

Wie in Abb. 20 dargestellt, führte die Expression des E1A_{12S}-Proteins (Spur 3) und die Koexpression mit hBRG1 (Spur 6) zu einer effektiven Präzipitation des E2_{Ad12}-Promotors mit dem anti-hBRG1 Antiserum. Die Präzipitation mit einem anti-H4-Antiserum zeigte, dass es in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins zu einer erhöhten Acetylierung von Histon H4 kommt (Abb. 20, vgl. Spuren 2 und 3). Diese Ergebnisse bestätigten die Daten von Fax *et al.* (2000), in denen eine Aktivierung der HAT-Aktivität von CBP durch das E1A_{12S}-Protein nachgewiesen wurde. Erstaunlicherweise führte eine Überexpression von hBRG1 sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins zu einer erhöhten Acetylierung des Promotor-assoziierten Histons H4 (Abb. 20, Spuren 4 und 6). Dies lässt vermuten, dass durch die Funktion von hBRG1, dem Remodellieren der Chromatinstruktur, die CBP/p300-vermittelte Acetylierung der Histone H4 erleichtert wird und dass möglicherweise beide Komplexe in gegenseitiger Abhängigkeit zur Aktivierung der Transkription des E2_{Ad12}-Promotors beitragen.

Die Überexpression von HDAC1 wirkte in allen Ansätzen der Acetylierung von Promotor-assoziiertem Histon H4 entgegen (Abb. 20, Spuren 5, 7-8, und 10). Bei der Überexpression von HDAC1 wurde interessanterweise eine starke Abnahme der mit dem anti-hBRG1 Antiserum präzipitierten E2_{Ad12}-Promotor-DNA beobachtet (Abb. 20, Spuren 7 und 8). Dies deutet darauf hin, dass zumindest die Acetylierung der Promotor-assoziierten Histone H4 für die Bindung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor von Bedeutung ist.

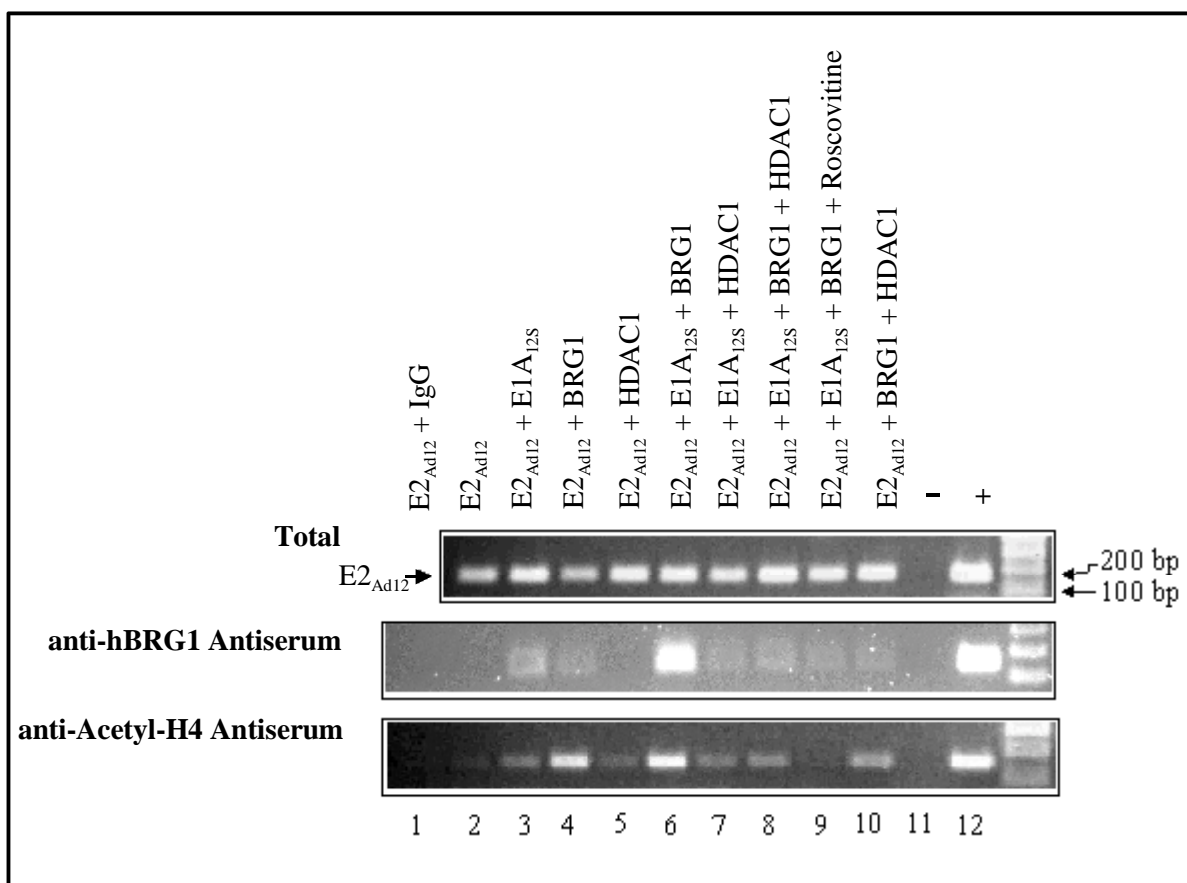


Abb. 20 Die Histondeacetylase HDAC1 und der CBP-Inhibitor Roscovitine inhibieren die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo*. KB-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT und pRc/RSV-E1A_{12S} und pBJ5-hBRG1 Expressionsvektoren, in Ab- oder Anwesenheit des pCMV-HA-HDAC1-Expressionsvektors (Spuren 5, 7, 8 und 10) oder in Anwesenheit von Roscovitine (Spur 9), wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. Roscovitine wurde 30 h nach Transfektion in einer Konzentration von 25 μ M in das Zellkulturmedium gegeben. 40 h nach Transfektionsbeginn wurde die DNA präpariert, ultraschallbehandelt, mit einem anti-hBRG1-Antiserum (mittlere Darstellung) oder einem anti-Acetyl-H4-Antiserum (untere Darstellung) oder Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen IgG, mittlere und untere Darstellung, Spur 1) immunpräzipitiert und durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor analysiert. Aliquots der ultraschallbehandelten DNA wurden vor der Immunpräzipitation analysiert (Total; obere Darstellung). Die Position der E2_{Ad12}-Promotorfragmente ist unten links, der Molekulargewichtstandard rechts angegeben. Die Spuren 11 und 12 zeigen die PCR-Kontrollen.

Zur Bestätigung dieser Daten wurde Roscovitine, ein Reagenz, das durch die Inhibierung der CyclinE/cdk2-vermittelten Phosphorylierung von CBP/p300 die Aktivierung der HAT-Funktion dieser Koaktivatoren verhindert (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998), eingesetzt. Wie in Abb. 20 dargestellt, wurde in Gegenwart von Roscovitine die E1A_{12S}-induzierte HAT-Aktivität von CBP/p300 weitgehend gehemmt (mittlere Darstellung; Spur 9). Auch die Bindung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor wurde in Anwesenheit von Roscovitine effizient inhibiert (Abb. 20, untere Darstellung; Spur 9).

Transiente Expressionsstudien mit dem Acetylase-Inhibitor Roscovitine zeigen, dass die E1A_{12S}/hBRG1-abhängige Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch Roscovitine, in der für die CHIP-Analysen eingesetzten Konzentration (25 µM), stark reprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Western-Blot-Analysen der für die transienten Expressionsanalysen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, dass die E1A_{12S}- und hBRG1-Proteinexpression in den transfizierten Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit von Roscovitine vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). Die verminderte Bindung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* sowie die Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität in Anwesenheit von Roscovitine sind somit nicht auf unterschiedliche Konzentrationen dieser Proteine in den Zellen zurückzuführen.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass der Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität der zellulären Koaktivatoren CBP/p300 eine wichtige Funktion bei der Assoziation der ATPase-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe BRG1 an den adenoviralen E2_{Ad12}-Promotor zukommt. Hierbei könnte durch die Acetylierung der Histonproteine in der E2_{Ad12}-Promotorregion die Nukleosomenstruktur so geändert werden, dass hBRG1 oder möglicherweise auch weitere Komponenten der Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe an den Promotor binden können. Weiterhin könnten durch die Acetylierung der Histonproteine in der E2_{Ad12}-Promotorregion Bindestellen für die Assoziation von hBRG1 geschaffen werden bzw. die Bindung von hBRG1 an den Promotor stabilisiert werden. Hierfür sprechen die Ergebnisse der „squelching-type“-Studien, in denen die Bromodomäne der hBRG1-Untereinheit, welche mit hoher Affinität an acetylierten Histonproteinen bindet (Owen *et al.*, 2000; Denis, 2001), eine starke Repression der E1A_{12S}/hBRG1-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bewirkte (s. Kap. 4.6).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eine Kooperation zwischen den beiden Gruppen der Chromatin-remodellierenden Komplexe, den Histonacetyltrasen und den ATP-abhängigen hSWI/SNF-Komplexen, notwendig ist und dass die Rekrutierung von diesen Chromatin-modifizierenden und Chromatin-remodellierenden Faktoren durch das virale Protein effizient koordiniert wird.

5. Diskussion

Die E1A-Proteine der Adenoviren sind als Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Transkriptionseinheiten (E1B, E2, E3, E4 und L1-L5) essentiell (Berk, 1986). Neben der Regulation der viralen Gene kann die Expression zellulärer Gene durch E1A-Proteine sowohl positiv als auch negativ moduliert werden (Brockmann und Esche, 1995). Die E1A-Proteine besitzen keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985) und vermitteln ihre genregulatorischen Funktionen durch Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen zellulären Faktoren wie z. B. DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren, Repressoren zellulärer Transkriptionsfaktoren, Faktoren des basalen Transkriptionsapparates oder zellulären Koaktivatoren (s. Kap 1.4). Da die virale DNA, ähnlich wie die zelluläre DNA, im Zellkern in einer Chromatinstruktur organisiert vorliegt, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren, wie z. B. Histonacetyltransferasen oder ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexen, für die Aktivierung der Expression der adenoviralen und die Modulation der Expression zellulärer Gene, von besonderer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach einer möglichen Interaktion von Komponenten ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender hSWI/SNF-Komplexe mit E1A-Proteinen. Als Modellsystem für die Untersuchungen wurde der adenovirale E2_{Ad12}-Promotor verwendet, dessen Aktivierung durch das E1A_{12S}-Protein reguliert wird.

Durch meine Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das E1A_{12S}-Protein mit den ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen, welche BRG1 als ATPase-Untereinheit enthalten, interagiert (s. Kap. 5.1). Diese Interaktion trägt entscheidend zu der Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors bei (s. Kap. 5.2). Zudem zeigen die Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors, dass die Acetylierung von promotorassoziierten Histonen eine Voraussetzung für die E1A_{12S}/hBRG1-induzierte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors ist (s. Kap. 5.3). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eine Kooperation beider Gruppen der Chromatin-remodellierenden Komplexe, den Histonacetyltransferasen und den ATP-abhängigen hSWI/SNF-Komplexen, für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig ist.

5.1 Die ATPase-Untereinheit BRG1 der Chromatin-remodellierende hSWI/SNF-Komplexe interagiert mit dem E1A_{12S}-Protein

Änderungen in der Chromatinstruktur bei der Aktivierung oder Reprimierung der Expression von Genen erfordern die enzymatische Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs), Histondeacetylasen (HDACs) und Nukleosom-remodellierenden Faktoren, wie z. B. SWI/SNF-Komplexen (Cheung *et al.*, 2000; Aalfs und Kingston, 2000). E1A-Onkoproteine können bei der Regulation der Transkription viraler sowie spezifischer zellulärer Gene die Aktivität der Chromatin-modifizierenden Faktoren, direkt oder indirekt beeinflussen (s. Kap 1.8). Es wurde mehrfach belegt, dass die E1A-Proteine an zelluläre Koaktivatoren mit HAT-Aktivität, wie z. B. CBP/p300 und PCAF, binden und dass diese Bindung für die Regulation der Genexpression durch die E1A-Proteine von essentieller Bedeutung ist (s. Kap 1.4).

In humanen Zellen wurden, wie in Kap. 1.7 beschrieben, verschiedene hSWI/SNF-Komplexe identifiziert. Diese Komplexe unterscheiden sich voneinander durch das Vorkommen der BRM- oder der BRG1-ATPase-Untereinheit sowie einiger anderer BRG1/BRM-assoziiierter Faktoren (BAFs). Die beiden hoch homologen ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe sind über die Bindung an zelluläre Faktoren (z. B. p105RB) an der Regulation der Zell-Proliferation und -Differenzierung beteiligt. Über die Interaktion mit nukleären Rezeptoren, wie z. B. dem Glucocorticoid- und dem Östrogen-Rezeptor, sind sie zudem in der Aktivierung der Transkription eine Reihe Hormon-abhängiger Gene involviert (Strober *et al.*, 1996; Nie *et al.*, 2000; Belandia *et al.*, 2002). Trotz der funktionellen Gemeinsamkeiten scheint es, dass diese ATPase-Untereinheiten (hBRG1, hBRM) ihre biologischen Funktionen in den SWI/SNF-Komplexen an unterschiedlichen Genen der Zelle ausüben. So konnte beispielsweise bei einigen hSWI/SNF-abhängigen Promotoren gezeigt werden, dass nur eine dieser ATPase-Untereinheiten, hBRG1 oder hBRM, zur Regulation der Expression des jeweiligen Gens beteiligt ist (Cosma, 2002; Kadam und Emerson 2003). Die Chromatin-remodellierende Aktivität dieser ATPasen wird durch die Interaktion mit spezifischen Transkriptionsfaktoren an den Promotor rekrutiert. Die Funktionen der anderen Proteinuntereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe sind noch weitgehend unbekannt.

Durch die Protein-Protein-Interaktionsanalysen konnte im Zuge meiner Arbeit eine direkte Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit den ATP-abhängigen Chromatin-

remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen nachgewiesen werden. Hierbei wurde in dem von mir verwendeten experimentellen System allerdings eine Interaktion nur mit der ATPase-Untereinheit BRG1 der hSWI/SNF-Komplexe und nicht mit BRM beobachtet (s. Kap. 4.7). Meine Untersuchungen belegen weiterhin, dass das E1A_{12S}-Protein mit hBRG1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* interagiert (s. Kap. 4.4 und 4.7). Als die für diese Interaktion verantwortlichen Proteindomänen wurden, durch Verwendung von Proteinmutanten, der N-Terminus und die CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins, sowie die HC- und die ATPase-Domäne von hBRG1 identifiziert (s. Kap. 4.4 und 4.5).

Eine Interaktion zwischen viralen transaktivierenden Proteinen und den ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen ist nicht auf das adenovirale E1A_{12S}-Protein beschränkt. So konnte beispielsweise die Interaktion von HIV-1 Integrase (Kalpana *et al.*, 1994), c-Myc (Cheng *et al.*, 1999), ALL1 (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 1998), EBNA2 (Wu *et al.*, 2000) und HPV-18 E1 (Lee *et al.*, 1999) mit einer der Core-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe (Ini1) gezeigt werden. Diese Interaktionen tragen zu den genregulierenden Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren bei. Zudem zeigen Daten der Arbeitsgruppe von Choe, dass das HPV E7-Protein mit hBRG1 interagiert und dass diese Interaktion für die transaktivierende Funktion des viralen Proteins von Bedeutung ist (Lee *et al.*, 2002). Interessanterweise erfolgt diese Interaktion über die HC- und ATPase-Domäne des hBRG1-Proteins, welche auch für die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an hBRG1 verantwortlich sind (s. Kap. 4. 5).

Schon frühere Studien über die Funktionen von E1A-Proteinen in *S. cerevisiae* haben eine Interaktion der adenoviralen E1A-Onkoproteine mit ySWI/SNF-Komplexen vermuten lassen (Miller *et al.*, 1996; Mymryk und Smith, 1997). So wurde z. B. beobachtet, dass die Überexpression von E1A-Wildtyp-Proteinen, in Abhängigkeit vom N-Terminus und der CR1-Domäne, in Hefezellen zu Phänotypen mit einem verringerten Wachstum führt. Hefestämme mit Mutationen in einer der Komponenten der ySWI/SNF-Komplexe zeigten jedoch keine Sensitivität gegenüber einer Überexpression von E1A-Proteinen. Diese Beobachtungen ließen die Autoren vermuten, dass ySWI/SNF-Komplexe für die Funktion der E1A-Proteine entscheidend sind und somit möglicherweise zelluläre Zielproteine der E1A-Onkoproteine darstellen. Diese Vermutungen wurden durch meine Daten, welche den Beweis für eine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit SWI/SNF-Komplexen in humanen Zellen erbracht haben, bestätigt. Zudem zeigen meine Ergebnisse, dass der N-Terminus und die CR1-Domäne des

E1A_{12S}-Proteins für die Bindung an hBRG1 *in vitro* und *in vivo* verantwortlich sind (s. Kap. 4.4, 4.5 und 4.7).

Die hSWI/SNF-Komplexe sind an der Regulation der Expression Zellzyklus-regulierender Gene beteiligt (s. Kap. 1.7). Hinweise hierfür sind Beobachtungen, dass viele Tumorzelllinien Mutationen zumindest in einer der Untereinheiten dieser Komplexe aufweisen (DeCristofaro *et al.*, 2001). Zudem wurde gezeigt, dass Komponenten der hSWI/SNF-Komplexe direkt mit einer Reihe von Zellzyklus-regulierenden Proteinen interagieren (s. Kap 1.7; Bochar *et al.*, 2000; Muchardt und Yaniv, 2001; Lee *et al.*, 2002). Eines der wichtigsten, solcher die Proliferation regulierenden Proteine ist das p105RB-Protein. Es spielt bei der Kontrolle der Expression von Genen, welche für den Übergang von G1- zur S-Phase des Zellzyklus benötigt werden, wie u. a. *cyklin E*, *myb* und *E2F1*, eine essentielle Rolle.

Studien mit hBRG1- und hBRM-defizienten humanen Zelllinien (z. B. C33A- oder SW13-Zellen) haben gezeigt, dass für eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F durch p105RB die Anwesenheit einer der ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe entscheidend ist (Zhang *et al.*, 2000; Strobeck *et al.*, 2001). Umgekehrt wurde gezeigt, dass die hBRG1-induzierte Arretierung der Zellen in der G1-Phase von einem funktionellen p105RB-Protein abhängig ist. Hierbei wurde eine Interaktion der beiden ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe mit dem p105RB-Protein mehrfach nachgewiesen (Strober *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Strobeck *et al.*, 2000). Dass nicht nur die ATPase-Untereinheiten durch ihre Interaktion mit p105RB an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wurde durch die Überexpression von Inl1, einer der Core-Komponenten der hSWI/SNF-Komplexe, gezeigt (Versteeg *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in allen diesen Studien der p105RB-hSWI/SNF-induzierte Zellzyklus-Arrest durch die Expression der adenoviralen E1A-Proteine aufgehoben werden (Dunaief *et al.*, 1994). Als möglichen Mechanismus für diese E1A-induzierte Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes diskutierten die Autoren eine Konkurrenz der E1A-Proteine mit hBRG1 um die Bindung an p105RB. Dies wurde durch die Identifizierung des sog. LXCXE-Motivs in der Prolin-reichen Domäne von hBRG1, einem Aminosäuresequenzmotiv, welches für die Bindung an p105RB verantwortlich ist und auch in anderen p105RB-bindenden Proteinen wie z. B. HDAC1 und HDAC2, HPV E7 und SV40 T-Antigen sowie in den adenoviralen E1A-Proteinen vorkommt, unterstützt (Dunaief *et al.*, 1994).

Die im Zuge meiner Arbeit nachgewiesene Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit hBRG1 bringt neue Einsichten in die E1A-induzierte Zellzyklus-Regulation. So könnte zusätzlich zur Bindung des E1A-Proteins an das p105RB-Protein die direkte Interaktion der E1A-Proteine mit dem hSWI/SNF-Komplex als möglicher Grund der E1A-bewirkten Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes in Frage kommen. Hierfür sprechen auch Daten der Arbeitsgruppe von Dean, die gezeigt haben, dass Mutationen in der LXCXE-Bindedomäne von p105RB, welche die Interaktion von p105RB mit E1A-Proteinen stark reprimiert, keinen Einfluss auf die Bindung von hBRG1 an das p105RB-Protein haben (Dahiya *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). So kann zumindest eine Konkurrenz der E1A-Proteine mit hBRG1 um die Bindung an das p105RB-Protein nicht als einziger Mechanismus für die Aufhebung des hSWI/SNF-p105RB-induzierten Zellzyklus-Arrestes in Betracht gezogen werden. Dies sollte durch weitere Analysen mit E1A- bzw. hBRG1-bindungsdefizienten Proteinmutanten zukünftig verifiziert werden.

5.2 Regulation der Genexpression durch das E1A_{12S}-Proteine und hSWI/SNF-Komplexe

Die SWI/SNF-Komplexe stellen unter den Energie-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexen die am besten charakterisierten Komplexe dar. Außer Beteiligung an der Regulation zellulärer Prozesse, wie z. B. Genexpression, DNA-Replikation und DNA-Reparatur, spielen die hSWI/SNF-Komplexe auch bei viralen Replikationszyklen von DNA-Viren und Retroviren eine wichtige Rolle. Die Interaktion der In11-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe mit dem HPV E1-Protein ist z. B. bei der Replikation des humanen Papillomavirus essentiell (Lee *et al.*, 1999). Die hSWI/SNF-Komplexe, die BRM als ATPase-Untereinheit besitzen, sind auch bei der Expression retroviraler Gene von der in das Wirtsgenom integrierten Provirus-DNA von entscheidender Bedeutung (Mizutani *et al.*, 2002).

Es wurde mehrfach belegt, dass die ATPase-Untereinheiten der SWI/SNF-Komplexe die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie zur Änderung der nukleosomalen Struktur verwenden. In Abhängigkeit von den *in vitro* verwendeten Systemen konnten hierbei verschiedene Mechanismen, wie z. B. Änderungen in der Topologie der DNA (Havas *et al.*, 2000) oder die Verschiebung von Histon-Octameren entlang der DNA (*cis*-movement; Whitehouse *et al.*, 1999), beobachtet werden. Es wird vermutet, dass durch solchen

Mechanismen in Promotorbereichen der entsprechenden Gene, Nukleosom-freie Regionen bzw. Regionen mit veränderten nukleosomalen Strukturen entstehen, und durch Bindung von transkriptionell aktiven Faktoren an diese strukturell veränderten Promotorregionen die Initiation der Transkription ermöglicht wird (Utley *et al.*, 1997; Logie *et al.*, 1999). Da die SWI/SNF-Komplexe selbst keine signifikante DNA-Bindeaktivität besitzen (Holstege *et al.*, 1998), werden sie und ihre Chromatin-remodellierende Aktivität durch die Protein-Protein-Interaktion mit genspezifischen Aktivatoren an den Promotor rekrutiert (Neely *et al.*, 1999; Kadam *et al.*, 2000). SWI/SNF-Komplexe sind nicht nur an der Aktivierung sondern auch an der Repression der Transkription beteiligt. Dies zeigen Expressionsstudien SWI/SNF-abhängiger Gene in Hefen, in denen Mutationen in einer der Untereinheiten dieser Chromatin-remodellierenden Komplexe zu einer erhöhten Expression von ca. der Hälfte der ySWI/SNF-abhängigen Gene führt (Holstege *et al.*, 1998; Sudarsanam *et al.*, 2000). Ob die ySWI/SNF-bewirkte Repression direkt, durch die Erschaffung von transkriptionell inaktiven nukleosomalen Strukturen im Promotorbereich bzw. durch die Erleichterung der Bindung von Repressorproteinen an ihre Zielsequenzen auf der DNA oder indirekt, durch eine Beteiligung an der Expression der Transkription reprimierender Proteine bewirkt wird, ist noch ungeklärt.

Die von mir durchgeführten transienten Expressionsstudien zur Analyse des Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors zeigen erstmalig, dass die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors beteiligt sind (s. Kap. 4.2). Diese Aktivierung ist nicht auf eine hSWI/SNF-abhängige Überexpression von einigen der bekannten an der E2_{Ad12}-Promotoraktivierung beteiligten Faktoren, wie z. B. CREB-1/ATF-1 oder CBP/p300 zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Meine Untersuchungen belegen zudem, dass nur hSWI/SNF-Komplexe, die BRG1 als ATPase-Untereinheit enthalten, bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors mitwirken. Die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors ist spezifisch von den transaktivierenden Funktionen des E1A_{12S}-Proteins abhängig, da keine Änderungen der Expression anderer, nicht durch E1A-Funktionen aktivierter Gene in Gegenwart der ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe beobachtet wurde.

Meine Experimente belegen weiterhin, dass die Spezifität der hSWI/SNF-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch eine direkte Interaktion des E1A_{12S}-Protein mit hBRG1 bewirkt wird. So konnte ich zeigen, dass die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors von Funktionen des N-Terminus und der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins abhängig ist (s. Kap. 4.3). Beide Domänen sind sowohl für die Bindung an hBRG1 *in vitro*

und *in vivo*, als auch für die E1A_{12S}-vermittelte Rekrutierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* verantwortlich (s. Kap. 4.5, 4.7 und 4.11). Zudem führt eine Überexpression der HC- oder der ATPase-Domäne der hBRG1-Untereinheit zur Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität (s. Kap. 4.6). Da beide hBRG1-Proteindomänen an das E1A_{12S}-Protein binden können, verhindert deren Expression vermutlich die Interaktion des hBRG1-Wildtyp-Proteins mit dem E1A_{12S}-Protein. Diese Daten bestätigen, dass für die Funktion von hBRG1 bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eine Interaktion mit dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein entscheidend ist.

In hBRG1- und hBRM-defizienten Zelllinien (C33A, SW13) führt die exogene Expression von hBRG1 nur zu einer geringfügigen Erhöhung der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors (s. Kap. 4.9). Allerdings konnte ich durch CHIP-Analysen eine verstärkte Rekrutierung von hBRG1 durch das E1A_{12S}-Protein an den E2_{Ad12}-Promotor in diesen Zelllinien *in vivo* beobachten (s. Kap. 4.10).

Im Gegensatz zu hBRG1 konnte hBRM die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors nicht beeinflussen. Dies korreliert mit meinen Daten aus *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsanalysen, in denen keine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der hBRM-Untereinheit nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 4.7).

Da die meisten Untereinheiten der hBRG1- oder hBRM-enthaltenden SWI/SNF-Komplexe identisch sind, und es durch die ectopische Expression einer der Untereinheiten zur Assoziierung mit den anderen Komponenten und zur Bildung von funktionellen hSWI/SNF-Komplexen kommt (Wang *et al.*, 1996; sif *et al.*, 2001), könnte man annehmen, dass bei einer ectopischen Überexpression von hBRM das Gleichgewicht zugunsten der Bildung von hBRM-enthaltenden SWI/SNF-Komplexe verschoben wird. Dies sollte mit einer Reduktion der E1A_{12S}/endogenen-hBRG1-vermittelten E2_{Ad12}-Promotoraktivierung einhergehen. Dass dies von mir jedoch nicht beobachtet wurde (s. Kap. 4.2), spricht ebenfalls für eine direkte Bindung des E1A_{12S}-Proteins an hBRG1 *in vivo* und nicht für eine indirekte Rekrutierung des hSWI/SNF-Komplexes, durch die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an eine andere Untereinheit des hSWI/SNF-Komplexes.

In Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen sind auch Daten der Arbeitsgruppe von Walfish, die zeigen, dass für die E1A-induzierte Aktivierung Thyroid-Hormon-abhängiger Promotoren in Hefen die Funktion von ySWI/SNF-Komplexen entscheidend ist (Meng *et al.*, 2003). Obwohl bei diesen Untersuchungen keine Analysen zur Interaktion der E1A-Proteine mit ySWI/SNF-Komplexen durchgeführt wurden, weisen die Autoren aufgrund von E1A-

Proteinmutanten nach, dass das N-terminale Ende der E1A-Proteine für diese Aktivierung essentiell ist.

Eigene Versuche der Generierung einer Zelllinie, zur Überprüfung der funktionellen Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der hBRG1-Untereinheit bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors auf chromosomaler Ebene, mit einem stabil integrierten adenoviralen E2_{Ad12}-Promotor waren aufgrund der nicht-Induzierbarkeit des E2_{Ad12}-Promotors (durch die E1A-Proteine oder der katalytischen PKA C α -Untereinheit) bzw. der hohen Basalaktivität des E2_{Ad12}-Promotors, nicht erfolgreich. Daher sollen weitere Zellklone, in denen der E2_{Ad12}-Promotor an anderen Positionen im Zellgenom integriert vorliegt, in diese Untersuchungen mit einbezogen werden. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass die adenoviralen E1A-Proteine die Expression auch von in das Wirtsgenom integrierten hSWI/SNF-abhängigen Promotoren, wie z. B. dem MMTV-Promotor, aktivieren (Soeth *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen haben Miller *et al.* (1996) berichtet, dass die Überexpression von E1A-Proteinen in Hefen zu einer Inhibierung der Expression einer Reihe ySWI/SNF-abhängiger Gene führt. Für die Expression einer Vielzahl von ySWI/SNF-abhängigen Genen ist die funktionelle Interaktion dieser Komplexe mit yHAT-Komplexen (z. B. SAGA-Komplexe) von entscheidender Bedeutung (Krebs *et al.*, 2000; Hassan *et al.*, 2001). Da eine Interaktion der E1A-Proteine mit Komponenten der SAGA-Komplexe, wie u. a. Gcn5 und Tra1 gezeigt wurde (Kulesza *et al.*, 2002; Shuen *et al.*, 2002), könnte die E1A-bewirkte Repression der ySWI/SNF-abhängigen Hefegene indirekt, durch die Störung der Funktion der SAGA-Komplexe verursacht werden.

Trotz dieser Möglichkeit ist sowohl in Hefen, als auch in humanen Zellen, eine durch die E1A-bewirkte Inhibierung der Funktion der SWI/SNF-Komplexe, in Abhängigkeit des Promotors und der an dessen Regulation beteiligten Faktoren, durchaus vorstellbar. Wie es bei den Chromatin-modifizierenden Faktoren, z. B. CBP/p300 und PCAF gezeigt wurde, kann eine direkte Interaktion der E1A-Proteine mit diesen Faktoren deren Funktionen sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen (Yang *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1998; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Hamamori *et al.*, 1999). Dies ist vermutlich abhängig von weiteren, noch unbekannten Faktoren in Promotorkontext der entsprechenden Gene.

Die Modulation der Funktion der Chromatin-remodellierenden Faktoren spielt im Verlauf der adenoviralen Infektion und des Transformationsprozesses, durch Repression von Genen, die an der Kontrolle des G1-Arrestes und der Differenzierung beteiligt sind

The diagram illustrates the role of the hSWI/SNF complex in transcription regulation and transformation. At the top, a circle labeled 'HAT' and a rectangle labeled 'E1A' are shown next to a dashed circle containing a question mark. Below these is an oval labeled 'hSWI/SNF-Komplexe'. A dotted line connects this complex to a 'Zellzyklus' (cell cycle) label on the right. The central part of the diagram shows two DNA segments. The top segment has a repressed state (indicated by a large 'X' over the promoter) and a downward arrow. The bottom segment has an active state (indicated by an arrow) and an upward arrow. The text 'Ad12 E2-Promotor' is written below the DNA segments. The left side is labeled 'Transkriptionsregulation' and the right side is labeled 'Transformation'.

5.3 Der hSWI/SNF-abhängige Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors

83

Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor (s. Kap. 4.10), welche mit einer stark erhöhten PKA/hBRG1-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors gut korreliert. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse aus CHIP-Analysen mit der E2_{Ad12}ΔCRE-Promotormutante, dass die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor durch den cAMP-abhängigen Signalweg induziert wird (s. Kap. 4.10). Obwohl in hBRG1- und hBRM-defizienten Zelllinien auch hBRM zur PKA-abhängigen Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in der Lage ist (s. Kap. 4.9), kann die Funktion von hBRG1 bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen durch hBRM nicht ersetzt werden (s. Kap. 4.8). Diese Daten belegen eindeutig, dass hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung CREB-abhängiger Gene beteiligt sind.

Aus meinen Untersuchungen geht ebenfalls hervor, dass für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors sowohl die Chromatin-remodellierende Funktion der hSWI/SNF-Komplexe, als auch die Aktivität der Histonacetyltransferasen (CBP/p300) benötigt wird. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Ergebnissen einer Reihe von Expressionsstudien mit SWI/SNF-abhängigen Genen, welche die Beteiligung von Chromatin-modifizierenden Faktoren an der Aktivierung dieser Gene zeigen. So wurde beispielsweise in Hefezellen gezeigt, dass obwohl die Inaktivierung beider Chromatin-remodellierenden Komplexe (SWI/SNF, HATs) für die Zellen letal ist, Mutationen in einem dieser Komplexe nur zu einer verminderten Expression dieser Gene führt (Pollard und Peterson, 1997; Roberts und Winston, 1997). Anscheinend können die Funktionen einer der Chromatin-remodellierenden Komplexe zum Teil durch Funktionen der anderen Komplexe ersetzt werden.

Untersuchungen zu den Rekrutierungsmechanismen der SWI/SNF- und HAT-Komplexe in Hefen und humanen Zellen belegen, dass die Aktivität dieser Komplexe durch die Interaktion mit Aktivatoren an den jeweiligen Promotor rekrutiert wird (Utley *et al.*, 1998; Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovky *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 2000). Hierbei kann jedoch kein allgemein gültiger Mechanismus für die Rekrutierungen dieser Chromatin-remodellierenden Komplexe beobachtet werden. Vielmehr lassen diese Untersuchungen vermuten, dass die Rekrutierung der Chromatin-remodellierenden Komplexe, abhängig vom jeweiligen Promotor spezifisch erfolgt. Die Aktivator-abhängige Rekrutierung der beiden Chromatin-remodellierenden Komplexe kann unabhängig voneinander (z. B. im Falle des Hefe HIS3-Promotors; Syntichaki *et al.*, 2000), oder in Abhängigkeit von der Funktion des jeweils anderen Chromatin-remodellierenden Komplexes erfolgen. Bekannte Beispiele für den

letzteren Fall sind der HO- (Cosma *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999) bzw. IFN- β -Promotor (Agalioti *et al.*, 2000). Bei der Aktivierung beider Promotoren ist die Funktion einer dieser Chromatin-remodellierenden Komplexe für die anschließende Rekrutierung des anderen Komplexes notwendig. Während bei der HO-Promotoraktivierung die Funktion der ySWI/SNF-Komplexe für die Rekrutierung des SAGA HAT-Komplexes erforderlich ist, sind die Funktionen der HAT-Komplexe hGCN5 und CBP/p300 für die Rekrutierung der hSWI/SNF-Komplexe an den IFN- β -Promotor eine Voraussetzung.

Meine Daten belegen, dass es bei der Aktivierung des CREB-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors zu einer E1A_{12S}- und/oder PKA-abhängigen Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor kommt (s. Abb. 22 und Kap. 4.10). Die Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eine Abhängigkeit zwischen den Funktionen der hSWI/SNF-Komplexe und den der zellulären CBP/p300-Histonacetyltransferasen besteht. Die Überexpression von Histondeacetylase-1 (HDAC1) in transienten Expressionsanalysen führte zu einer starken Repression der hBRG1-vermittelten E2_{Ad12}-Promotoraktivierung (s. Kap. 4.11). Entscheidend hierbei war, dass die HDAC1-vermittelte Repression des E2_{Ad12}-Promotors durch eine Überexpression von hBRG1 nicht beeinflusst werden konnte. Diese Daten sprechen dafür, dass die Acetylierung von Histonproteinen durch die Koaktivatoren CBP/p300 eine Voraussetzung für die hSWI/SNF-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors ist.

Für die Repression der hBRG1-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch Histonacetylase-1 gäbe es eine Reihe von möglichen Erklärungen: zum Beispiel könnte die Acetylierung von Histonen entweder (a) die Aktivität von hBRG1 stimulieren oder (b) eine Voraussetzung für die Rekrutierung des hBRG1-SWI/SNF-Komplexes an den Promotor sein. Es wäre auch denkbar, dass (c) die Acetylierung von hBRG1 selbst für die Aktivierung der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Funktion des Proteins von Bedeutung ist.

Da bereits durch Huang und Mitarbeiter gezeigt wurde, dass die Chromatin-remodellierende Aktivität des hBRG1-Proteins durch acetylierte Histonproteine nicht induziert bzw. verändert wird (Huang *et al.*, 2003), kann dieser Mechanismus zur Modulation der hBRG1-Funktion weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine Reihe von eigenen Daten sprechen dafür, dass die Acetylierung von Histonproteinen für die Rekrutierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor essentiell ist. Zum

einen konnte die Überexpression der Bromodomäne des hBRG1-Proteins in „squenching-type“-Studien die E1A_{12S}/hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors weitgehend inhibieren (s. Kap. 4.6). Die Bromodomäne, die mit hoher Affinität an acetylierte Histonproteine bindet, kommt in einer Vielzahl von an der Transkriptionsregulation beteiligten Proteinen vor (Owen *et al.*, 2000; Denis, 2001). Da in Protein-Protein-Interaktionsanalysen keine Interaktion zwischen der Bromodomäne der hBRG1-Untereinheit und dem E1A_{12S}-Protein beobachtet wurde (s. Kap. 4.5), wurde angenommen, dass die überexprimierte Bromodomäne von hBRG1 mit dem hBRG1-Wildtyp-Protein um die Bindung an acetylierte Histone kompetiert. Zum anderen wurde die Vermutung, dass die acetylierten Histonproteine als Bindestellen zur Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor beitragen, durch die Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitationen bestätigt (s. Kap. 4.12). In diesen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Histondeacetylase-1 (HDAC1) und Roscovitine die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* weitgehend inhibieren und dass zumindest die Acetylierung von mit dem E2_{Ad12}-Promotor assoziierten Histon H4 für die Rekrutierung bzw. die Stabilisierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor entscheidend ist. Diese Ergebnisse werden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, welche die Bedeutung der Histonacetylierungen bei der Stabilisierung der Bindung von hSWI/SNF-Komplexen an den Promotor gezeigt haben (Agalioti *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2002). In diesen Studien wurde die Lysinacetylierung von Histon H4 an der Aminosäureposition 8 als entscheidend für die Assoziierung von hBRG1 an den Promotor identifiziert.

Zahlreiche Fakten sprechen dafür, dass die Rekrutierung der SWI/SNF-Komplexen an den Promotor nicht allein von der Acetylierung der Histonproteine, sondern zusätzlich von einer Interaktion dieser Komplexe mit weiteren, Promotor spezifischen Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Zum Beispiel sind in Hefezellen die SWI/SNF-Komplexe nur an der Regulation von ca. 7% der Genen beteiligt (Holstege *et al.*, 1998). Die Regulation zahlreicher weiterer Hefe-Gene wird nur durch die Funktion von yHATs reguliert. Sollte die Histonacetylierung allein die Rekrutierung von ySWI/SNF-Komplexen an den Promotor bewirken, könnte auch die Beteiligung der ySWI/SNF-Komplexe an der Regulation dieser Gene erwartet werden. Zudem sind nur 100 bis 200 Kopien der SWI/SNF-Komplexe im Kern der Hefezellen vorhanden (Côté *et al.*, 1994). Diese Fakten lassen zusätzlich die Existenz Promotor-spezifischer Faktoren zur Rekrutierung von ySWI/SNF-Komplexen vermuten. In Übereinstimmung hiermit berichten Huang und Mitarbeiter (2003), dass die

Acetylierungen von Histonproteinen allein nicht für die Rekrutierung der hSWI/SNF-Komplexe an den Promotor ausreichend ist.

Meine Ergebnisse belegen, dass im Falle des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors eine direkte Interaktion des E1A_{12S}-Onkoproteins mit der BRG1-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe für die spezifische Rekrutierung dieser Komplexe entscheidend ist. Das E1A_{12S}-Protein wird durch Bindung an den zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 an den E2_{Ad12}-Promotor rekrutiert und ist für die Rekrutierung des BRG1-SWI/SNF-Komplexes an den Promotor und vermutlich für die Stabilisierung am Promotor verantwortlich. Hierfür sprechen die Daten, dass Proteinmutanten mit Deletions im N-Terminus bzw. der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins das hBRG1-Protein nicht mehr binden und den BRG1-enthaltenden hSWI/SNF-Komplex effizient an den E2_{Ad12}-Promotor rekrutieren können. (s. Kap. 4.4, 4.5, 4.7 und 4.10). Die entscheidende Rolle dieser Domänen des E1A_{12S}-Protein bei der kooperativen Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch hBRG1 wurde in den transienten Expressionsstudien eindeutig demonstriert (s. Kap. 4.3). Auch Studien anderer Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Promotorsystemen zeigen, dass die Interaktion mit Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktoren für eine Rekrutierung und stabile Bindung von SWI/SNF-Komplexen an den jeweiligen Promotor entscheidend ist (Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovky *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999)

Obwohl in meinen Analysen eine Interaktion von hBRG1 mit zellulären Faktoren, wie z. B. CREB-1/ATF-1 oder CBP/p300 nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eine weitere Interaktion von hBRG1 bzw. anderen Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe mit den am E2_{Ad12}-Promotor gebundenen zellulären Transkriptionsfaktoren durchaus vorstellbar. Hierfür spricht, dass hBRG1, wie ich zeigen konnte, auch in Abwesenheit von E1A-Proteinen über den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg entscheidend zu der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors beiträgt (s. Kap. 4.8). Hierbei wurde die PKA-induzierte Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor nachgewiesen (s. Kap. 4.10). Da bereits u. a. durch die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt ist, dass die durch die katalytische Untereinheit der PKA vermittelte Serinphosphorylierung von CREB-1/ATF-1 die Rekrutierung der zellulären Koaktivatoren CBP/p300 an den E2_{Ad12}-Promotor ermöglicht wird, wäre es auch denkbar, dass phosphoryliertes CREB-1/ATF-1 und/oder CBP/P300 an der Rekrutierung von hBRG1 an den Promotor beteiligt sein könnte.

Trotz dieser Möglichkeiten zeigen meine Experimente, dass das E1A_{12S}-Protein als hochaffine Bindestelle zur Rekrutierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor beiträgt. Durch gleichzeitige Interaktionen von hBRG1 mit anderen an den E2_{Ad12}-Promotor gebundenen Faktoren könnte die Assoziierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}-Promotor zusätzlich stabilisiert werden (s. Abb. 22).

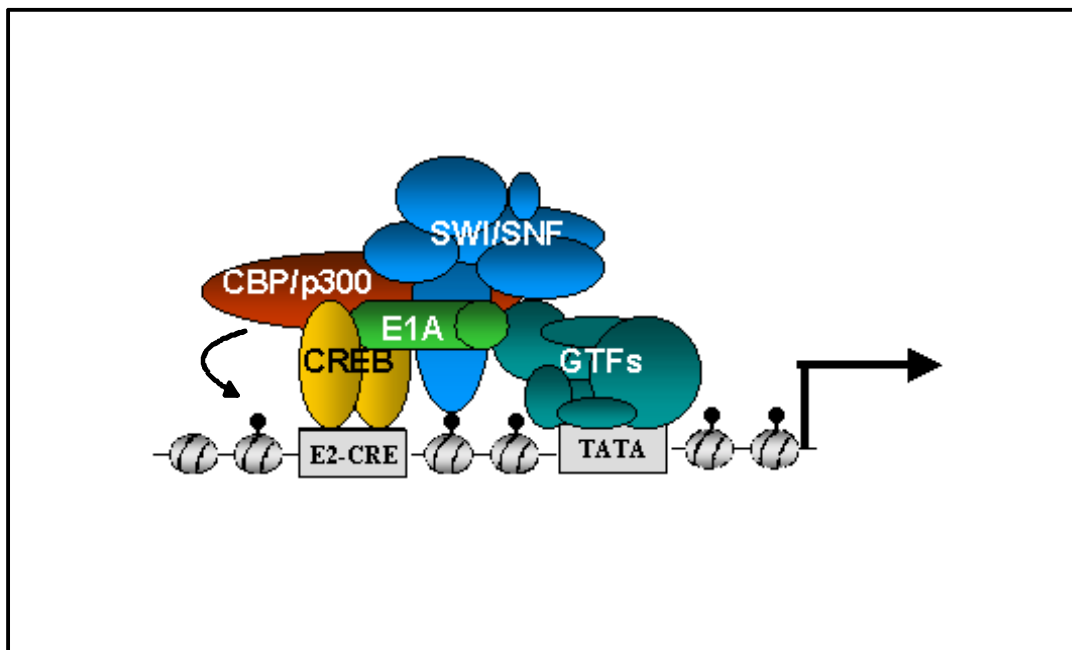


Abb. 22 Hypothetisches Modell der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein. Die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors wird durch die cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 (hier zusammenfassend als CREB dargestellt) vermittelt. Im Verlauf der Aktivierung des viralen Promotors kommt es durch das adenovirale E1A_{12S}-Protein zur Bildung eines Multifaktorkomplexes bestehend aus CREB, E1A_{12S}-Protein und den Chromatin-modifizierenden Faktoren CBP/p300 auf dem E2-CRE. Die durch CBP/p300-vermittelte Acetylierung von mit dem Promotor assoziierten Histonproteinen, sowie die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit hBRG1 ist für die anschließende Rekrutierung der hSWI/SNF-Komplexe essentiell. Die Chromatin-remodellierende Aktivität der hBRG1-Untereinheit trägt, möglicherweise durch die Erleichterung der Bindung des RNA-Polymerase-II-Holoenzym an die TATA-Sequenz, entscheidend zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bei.

Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit hBRG1 auch für die Aktivierung der ATPase-Aktivität der hBRG1-Untereinheit von Bedeutung ist. Wie in unserem Labor und durch andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt wurde, wird die HAT-Funktion der zellulären Koaktivatoren CBP/p300 durch die Interaktion mit E1A-Proteinen aktiviert (Fax *et al.*, 2000, Bannister und Kouzarides, 1996; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Ob eine direkte Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der hBRG1-Untereinheit die ATPase-Aktivität von hBRG1 stimuliert, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Die Klärung dieser Frage ist Ziel meinen gegenwärtigen Untersuchungen.

Die Modulation des cAMP/PKA-abhängigen Signalweges ist für die E1A-vermittelte Regulation viraler, wie auch zellulärer Gene, von entscheidender Bedeutung (Jones *et al.*, 1998). Fax *et al.* (2001) haben gezeigt, dass es durch die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die regulatorische Untereinheit RII α des PKA-Holoenzym zu einer Translokation dieser Untereinheit in den Zellkern kommt. Die gleichzeitige Expression von dem E1A_{12S}-Protein und der RII α -Untereinheit führte zu einer starken Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. Hierbei gehen wir gegenwärtig von einer Rekrutierung der RII α -Untereinheit durch das E1A_{12S}-Protein an den E2_{Ad12}-Promotor aus, welche dann als ein Adapter für die katalytische Untereinheit im Zellkern dient. Die durch die katalytische Untereinheit induzierte Phosphorylierung von CREB-1/ATF-1, sowie die Phosphorylierung der zellulären Kofaktoren CBP/p300, ist für die Aktivierung CREB-abhängiger Gene essentiell (Mayr und Montminy, 2001). Neben der Phosphorylierung dieser Faktoren besteht die Möglichkeit, dass hBRG1 bzw. Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe im Aktivierungsprozess des E2_{Ad12}-Promotors als potentiell Substrat der katalytischen Untereinheit der PKA dienen. Eigene noch vorläufige Untersuchungen weisen auf eine Acetylierung der hBRG1-Untereinheit *in vivo* hin (Daten nicht gezeigt). Inwieweit bzw. ob solche post-translationalen Modifikationen für die Regulation der Chromatin-remodellierenden Aktivität der hSWI/SNF-Komplexe im Aktivierungsprozess des E2_{Ad12}-Promotors von Bedeutung sind und welche Rolle hierbei dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein zukommt, muss noch geklärt werden.

Für den Mechanismus der Aktivierung der Genexpression durch die Rekrutierung von ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden SWI/SNF-Komplexen sind bisher drei Modelle vorgeschlagen worden. Im sog. „Catalytic Model“ (Owen-Hughes *et al.*, 1996; Logie und Peterson, 1997) wird von unspezifischen und zufälligen Änderungen der chromosomalen DNA durch diese Komplexe ausgegangen, welche dann durch die Anwesenheit von Aktivatoren stabilisiert werden.

In einem weiteren Modell, dem sog. „Holoenzyme Model“, wird eine generelle Rekrutierung der SWI/SNF-Komplexe durch das RNA-Polymerase-II-Holoenzym vorgeschlagen (Cho *et al.*, 1998; Neish *et al.*, 1998). Wie in meinen Untersuchungen, konnte in zahlreichen weiteren Studien die Assoziierung von BRG1 mit dem RNA-Polymerase-II-Holoenzym jedoch nicht nachgewiesen werden (Myers *et al.*, 1998; Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999).

Aktuell wird von einer promotorspezifischen Rekrutierung der SWI/SNF-Komplexe durch die direkte Interaktion mit transkriptionellen Aktivatoren ausgegangen (sog. „Activator

Model“; Cosma *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999). Dieses Modell wird auch durch die Ergebnisse meiner Experimente unterstützt.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben neue Einblicke in die molekularen Mechanismen, wie adenovirale E1A-Proteine in der Regulation der Genexpression eingreifen. Wie die HAT-Komplexe, stellen auch die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe zelluläre Zielproteine der E1A-Proteine dar. Die Bindung an die hSWI/SNF-Komplexe ermöglicht den E1A-Proteinen die Expression viraler Gene im Replikationszyklus des Adenovirus zu aktivieren. Die ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Funktion der BRG1-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe würde die nukleosomale Struktur im Promotorbereich destabilisieren und dadurch eine verbesserte Zugänglichkeit des Promotors für den generellen Transkriptionsapparat, bzw. anderer regulatorischer Proteine, ermöglichen. Hierdurch wird eine effiziente Expression der adenoviralen Gene gewährleistet. Durch die Interaktion der E1A-Proteine mit hSWI/SNF-Komplexen stehen den adenoviralen Proteinen zudem möglicherweise bisher unbekannte Mechanismen, zur Modulation der zellulären Regulationsprozesse in infizierten und/oder transformierten Zellen, zur Verfügung. Es ist davon auszugehen, dass durch die Interaktion der E1A-Proteine mit hSWI/SNF-Komplexen die Expression einzelner Gene, in Abhängigkeit von an der Regulation des Promotors beteiligten Faktoren, sowohl positiv als auch negativ beeinflusst wird.

6. Zusammenfassung

Als Transkriptionsfaktoren sind die E1A-Proteine im Verlauf des lytischen Entwicklungszyklus u. a. für die Aktivierung der Expression aller anderen adenoviralen Gene essentiell. Da die virale DNA nach dem Eintritt in den Zellkern in Chromatin-ähnlichen Strukturen verpackt wird, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren, für die Aktivierung der Expression der viralen Gene, von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine Interaktion der E1A-Proteine mit den ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen nachgewiesen und somit die hSWI/SNF-Komplexe als neue zelluläre Zielproteine der adenoviralen E1A-Proteine identifiziert. Meine Untersuchungen zeigen, dass durch die Bindung der hSWI/SNF-Komplexe an die E1A-Proteine die Expression viraler Gene aktiviert wird.

Die Interaktion der E1A-Proteine mit hSWI/SNF-Komplexen erfolgt spezifisch an die ATPase-Untereinheit BRG1 der hSWI/SNF-Komplexe. Eine Interaktion der ATPase-Untereinheit hBRM mit E1A-Proteine wurde nicht nachgewiesen. Protein-Protein-Interaktionsstudien belegen, dass das E1A_{12S}-Protein an hBRG1 *in vitro* und *in vivo* bindet. Als die für diese Bindung verantwortlichen Proteindomänen wurden der N-Terminus und die CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins, sowie HC- und ATPase-Domäne der hBRG1-Untereinheit identifiziert. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen Expressionsanalysen des adenoviralen E2_{Ad12}-Promotors, dass nur die hBRG1-Untereinheit, und nicht hBRM, zu der E1A_{12S}-induzierten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors entscheidend beiträgt. Expressionsstudien mit hBRG1- bzw. E1A_{12S}-Proteinmutanten zeigen, dass der Interaktion dieser Proteine im Aktivierungsprozess des E2_{Ad12}-Promotors eine essentielle Rolle zukommt. Ausgehend von diesen Studien konnte in Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen die E1A_{12S}-abhängige Assoziierung der hBRG1-Untereinheit an den E2_{Ad12}-Promotor *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Bindung wird durch die Deletion des N-Terminus und der CR1-Domäne des viralen Proteins weitgehend inhibiert.

Analysen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors, über die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen Histonacetylierung und der Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors besteht. Die hBRG1-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors wird durch die Funktion der Histondeacetylase-1 stark inhibiert. Weiterhin

wurde von mir gezeigt, dass zumindest die Acetylierung von mit dem E2_{Ad12}-Promotor assoziierten Histon H4 für die Assoziierung der hBRG1-Untereinheit an den viralen Promotor notwendig ist. Zusammenfassend verdeutlichen meine Ergebnisse, dass zur Destabilisierung der transkriptionell repressiv wirkenden nukleosomalen Struktur im E2_{Ad12}-Promotorbereich, sowohl die ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Aktivität der hSWI/SNF-Komplexe, als auch die HAT-Aktivität der zellulären Kofaktoren CBP/p300 benötigt werden. Im Aktivierungsprozess des E2_{Ad12}-Promotors wird die Rekrutierung dieser Chromatin-modifizierenden und Chromatin-remodellierenden Faktoren durch das virale Protein effizient koordiniert und reguliert.

Anhand meiner Untersuchungen konnte zudem der erste Beweis für eine Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung CREB-abhängiger Gene durch den cAMP/PKA-abhängigen Signalweg erbracht werden.

7. Literaturverzeichnis

Aalfs J.D. und Kingston R. E. (2000): What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem. Sci.* **25**: 548-55.

Agalioti T., Chen G. und Thanos D. (2002): Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**:381-92.

Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T. und Thanos D (2000): Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* **103**:667-78.

Ait-Si-Ali S., Ramirez S., Barre F. X., Dkhissi F., Magnaghi-Jaulin L., Girault J. A., Robin P., Knibiehler M., Pritchard L. L., Ducommun B., Trouche D. und Harel-Bellan A. (1998): Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**:184-6.

Allan J., Smith B. J., Dunn B. und Bustin M. (1982): Antibodies against the folding domain of histone H5 cross-react with H1(0) but not with H1. *J Biol Chem.* **257**:10533-5.

Allfrey V. G., Faulkner R. und Mirsky A. E. (1964): Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 787-794.

Arents G., Burlingame R. W., Wang B. C., Love W. E. und Moudrianakis E. N. (1991): The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:10148-52.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R., et al., eds. (1997): Current protocols in molecular biology. New York: Wiley

Bailey A. und Mautner V. (1994): Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* **205**: 438-452.

Bannister A. J. und Kouzarides T. (1996): The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**:641-3.

Bannister A. J. und Miska E. A. (2000): Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 1184-92.

Bayley S. T. und Mymryk J. S. (1994): Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* **5**: 425-444.

- Becker P. B. und Horz W. (2002):** ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:247-73.
- Belandia B., Orford R.L., Hurst H.C. und Parker M. G. (2002):** Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J.* **21** :4094-103.
- Berger S.L., Pina B., Silverman N., Marcus G. A., Agapite J., Regier J.L., Triezenberg S. J. und Guarente L. (1992):** Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell.* **70**: 251-65.
- Berger S. L. (2002):** Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* **12**: 142-8.
- Berk A. J. und Sharp P. A. (1978):** Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell.* **14**: 695-711.
- Berk A. J. (1986):** Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 45-79.
- Berk A. J., Boyer T. G., Kapanidis A. N., Ebright R. H., Kobayashi N. N., Horn P. J., Sullivan S. M., Koop R., Surby M. A. und Triezenberg S. J. (1998):** Mechanisms of viral activators. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 243-252.
- Bernards R., Schrier P. I., Houweling A., Bos J. L., van der Eb A. J., Zylstra M. und Melief C. J. M. (1983):** Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**: 776-797.
- Birnboim H.C., Doly J. A. (1979):** rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-23.
- Bochar D. A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W. S., Wang W., Kashanchi F. und Shiekhhattar R. (2000):** BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* **102**: 257-265.
- Bradford M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brockmann D. und Esche H. (1995):** Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr Top Microbiol Immunol.* **199**:81-112.
- Brockmann D., Tries B. und Esche H. (1990):** Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning. *Virology* **179**: 585-590.

Brockmann D., Fax P., Hashemi R., Kullmann S., Lehmkuhler O., Nolte C. und Esche, H. (2001): Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.

Broker T. R., Keller C. C. und Roberts R. J. (1984): Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps* **3** (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.

Brownell J. E. und Allis C. D. (1995): An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:6364-8.

Brownell J. E. und Allis C. D. (1996): Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev.* **6**:176-84.

Brownell J. E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D. G., Roth S. Y. und Allis CD. (1996): *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**:843-51.

Bultman S., Gebuhr T., Yee D., La Mantia C., Nicholson J., Gilliam A., Randazzo F., Metzger D., Chambon P., Crabtree G. und magnuson T. (2000): A BRG1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* **6**: 1287-1295.

Burgert H. G., Maryanski J. L. und Kvist S. (1987): "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:1356-60.

Chakravarti D., Okryzko V. V., Kao H.-Y., Nash A., Chen H., Privalsky M. L., Nakatani Y. und Evans R. M. (1999): A viral mechanism for inhibition of p300 and P/CAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**: 393-403

Cheng S. W., Davies K. P., Yung E., Beltran R. J., Yu J. und Kalpana G. V. (1999): c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet.* **22**:102-5.

Cheung P., Allis C. D. und Sassone-Corsi P. (2000): Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**:263-71.

Cho H. G., Orphanides X., Sun X. J., Yang V., Ogryzko E., Lees Y., Nakatani Y. und Reinberg Y. (1998): A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 53-55-5363.

Cohen C. J., Shieh J. T. C., Pickles R. J., Okegawa T., Hsieh J. T. und Bergelson J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15191-15196.

Cosma M. P., Tanaka T. und Nasmyth K. (1999): Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**: 299-311.

Cosma M. P., Tanaka T. und Nasmyth K. (1999): Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**: 299-311.

Cosma M.P. (2002): Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* **10**: 227-36.

Côté J., Quinn J., Workman J. L. und peterson C. L. (1994): Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**: 53-60.

Cullan B. R. (2001): Journey to the center of the cell. *Cell* **105**: 697-700.

Dahiya A., Gavin M. R., Luo R. X. und Dean D. C. (2000): Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol.* **20**: 6799-805.

Davie J. R. und Spencer V.A. (1999): Control of histone modifications. *J. Cell. Biochem.* **32-33**: 141-148.

de La Serna I. L., Carlson K. A. und Imbalzano A. N. (2001): Mammalian SWI/SNF complexes promotr MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.* **27**: 187-190.

de La Serna I. L., Carlson K. A., Hill D. A., Guidi C. J., Stephenson R. O., Sif S., Kingston R. E. und Imbalzano A. N. (2000): Mammalian SWI-SNF complexes contribute to activation of the *hsp70* gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2839-51.

de la Serna I. L., Roy K., Carlson K. A. und Imbalzano A. N. (2001): MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative SWI/SNF chromatin remodeling enzymes. *J. Biol. Chem.* **276**: 41486-41491.

DeCristofaro M. F., Betz B. L., Rorie C. J., Reisman D. N., Wang W. und Weissman B. E. (2001): Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J. Cell. Physiol.* **186**: 136-45.

Dedon P. C., Soultis J. A., Allis C. D. undGorovsky M. A. (1991): A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Ana. Biochem.* **197**: 83-90.

Denis G. V. (2001): Duality in bromodomain-containing protein complexes. *Front. Biosci.* **6**: 849-52.

Dery C. V., Toth M., Brown M., Horvath J., Allaire S. und Weber J. M. (1985): The structure of adenovirus chromatin in infected cells. *J. Gen. Virol.* **66**: 2671-84

Dignam J. D., Lebovitz R. M. und Roeder R. G. (1983): Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-1489.

DiRenzo J., Shang Y., Phelan M., Sif S., Myers M., Kingston R. und Brown M. (2000): BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7541-9.

Doerfler W. (1969): Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.

Dunaief J. L., Strober B. E., Guha S., Khavari P. A., Alin K., Luban J., Begemann M., Crabtree G. R. und Goff S. P. (1994): The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**:1 19-30.

Duyndam M., van Dam H., van der Eb A. und Zantema A. (1996): The CR1 and CR3 domains of Adenovirus Type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2. *J. Virol.* **70**: 5852-5859

Dyson N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**: 2245-62.

Esche H. und Siegmann B. (1982): Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells. *J. Virol.* **60**: 99-113.

Fax P., Carlson C. R., Collas P., Tasken K., Esche H. und Brockmann D. (2001): Binding of PKA-RIIalpha to the Adenovirus E1A_{12S} oncoprotein correlates with its nuclear translocation and an increase in PKA-dependent promoter activity. *Virology* **285**: 30-41

Fax P., Lehmkuhler O., Kuhn C., Esche H. und Brockmann D. (2000): E1A_{12S}-mediated activation of the adenovirus type 12 E2 promoter depends on the histone acetyltransferase activity of p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **275**: 40554-40560.

Fax P., Lipinski, K. S., Esche H. und Brockmann D. (2000): cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A_{12S}, and CBP to the E2-CRE. *J. Biol. Chem.* **275**: 8911-8920.

Ferguson B., Kripple B., Andrisani O., Jones N., Westphal H. und Rosenberg M. (1985): E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661.

Flint J. und Broker T. R. (1981): Lytic infection by adenoviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses* (Tooze, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 443-547.

Flint J. und Shenk T. (1997): Viral transactivating proteins. *Ann. Rev. Genet.* **31**: 177-212.

Fuchs M., Gerber J., Drapkin R., Sif S., Ikura T., Ogryzko V., Lane W. S., Nakatani Y. und Livingston D. M. (2001): The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**: 297-307.

Fyodorov D. V. und Kadonaga J. T. (2001): The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* **106**: 523-525.

Gabler S., Schütt H., Groitl P., Wolf H., Shenk T. und Dobner T. (1998): E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.

Gallimore P. H. und Turnell A. S. (2001): Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**: 7824-7835.

Gariglio P., Llopis R., Oudet P. und Chambon P. (1979): The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a minichromosom. *J. Mol. Biol.* **131**: 75-105.

Gooding L. R., Elmore L. F., Tollefson A. E., Brody H. A. und Wold W. S. M. (1988): A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**: 341-346.

Greber U. F., Suomalainen M., Stidwill R. P., Boucke K., Ebersold M. W. und Helenius A. (1997): The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**: 5998-6007.

Greber U. F., Willetts M., Webster P. und Helenius A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**: 477-486.

Grunstein M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352

Grunstein M. (1998): Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* **93**: 325-8.

Gu W., Shi X. L. und Roeder R. G. (1997): Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.

Hagiwara M., Brindle P., Harootunian A., Armstrong R., rivier J., Vale W., Tsien R. und Montminy M. R. (1993): Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4852-4859.

Hamamori Y.m., Sartorelli V., Ogryzko V., Puri P. L., Wu H. Y., Wang J. Y. J., Nakatani Y. und Kedes L. (1999): Regulation of histone acetyltransferase p300 and PCAF by the bHLH protein twist and the adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* **96**: 405-413.

Harlow E. und Lane D. (1988): In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press, CSH, New York, USA.

Hassan A. H., Neely K. E., Vignali M., Reese J. C. und Workman J. L. (2001): Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front. Biosci.* **6**: 1054-1064.

Hassan A. H., Neely K. E. und Workman J. L. (2001): Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104**: 817-27.

Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M., Carrozza M. J. und Workman J. L. (2002): Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**: 369-79.

Havas K., Flaus A., Phelan M., Kingston R., Wade P. A., Lilley D. M. und Owen-Hughes T. (2000): Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell* **103**: 1133-1142.

Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R., Golub T. R., Lander E. S. und Young R.A. (1998): Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717-28.

Horwitz M. S., Scharff M. D. und Maizel J. V. (1969): Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion. *Virology* **39**: 682-684.

Huang Z.-Q., Li J., Sachs L. M., Cole P. A. und Wong J. (2003): A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and mediator for transcription. *EMBO J.* **22**: 2146-2155.

Ikedo M. A. und Nevins J. R. (1993): Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7029-7035.

Janknecht R. und Hunter T. (1996): A growing coactivator network. *Nature* **383**: 22-23.

Jones N. C., Rigby P. W. und Ziff E. B. (1998): Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* **2**: 267-281.

Kadam S. und Emerson B. M. (2003): Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* **11**: 377-389.

Kadam S., McAlpine G. S., Phelan M. L., Kingston R. E., Jones K. A. und Emerson B. M. (2000): Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* **14**: 2441-2451.

Kalpana G. V., Marmon S., Wang W., Crabtree G. R. und Goff S. P. (1994): Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* **266**: 2002-2006.

- Katsani K. R., Mahmoudi T. und Verrijzer C.P. (2003):** Selective gene regulation by SWI/SNF-related chromatin remodeling factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 113-41.
- Khavari P. A., Peterson C. L., Tamkun J. W., Mendel D. B. und Crabtree GR. (1993):** BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* **366**: 170-174.
- Kimelmann D., Miller J., Porter D. und Roberts B. (1985):** E1A regions of human adenoviruses and the highly oncogenic simian virus 7 are closely related. *J. Virol.* **53**: 399-409.
- Kingston R. E. und Narlikar G. J. (1999):** ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**: 2339-2352.
- Klochendler-Yeivin A. und Yaniv M. (2001):** Chromatin modifiers and tumor suppression. *Biochi. Biophys. ACTA* **1551**: M1-M10.
- Kornberg R. D. und Lorch Y. (1999):** Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome. *Cell* **98**: 285-294.
- Korzus E., Torchia J., Rose D. W., Xu L., Kurokawa R., McInerney E. M., Mullen T. M., Glass C. K. und Rosenfeld M. G. (1998):** Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase function. *Science* **279**: 703-707.
- Kowenz-Leutz E. und Leutz A. (1999):** A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell* **4**: 735-743.
- Krebs J. E., Fry C. J., Samuels M. L. und Peterson C. L. (2000):** Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**: 587-98.
- Krebs J. E., Kuo M. H., Allis C. D. und Peterson C. L. (1999):** Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev.* **13**: 1412-1421.
- Krebs J. E. und Peterson C. L. (2000):** Understanding "active" chromatin: a historical perspective of chromatin remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **10**: 1-12.
- Kruger W., Peterson C. L., Sil A., Coburn C., Arents G., Moudrianakis E. N., Herskowitz I. (1995):** Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. *Genes Dev.* **9**: 2770-9.
- Kulesza C. A., Van Buskirk H. A., Cole M. D., Reese J. C., Smith M. M. und Engel D. A. (2002):** Adenovirus E1A requires the yeast SAGA histone acetyltransferase complex and associates with SAGA components Gcn5 and Tra1. *Oncogene* **21**: 1411-1422.
- Kurokawa R., Kalafus D., Ogliastro M. H., Kioussi C., Xu L., Torchia J., Rosenfeld M. G. und Glass C. K. (1998):** Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* **279**: 700-703.

Laemmli U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophag T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lee B. H. und Mathews M. B. (1997): transcriptional coactivator cAMP response element binding protein mediates induction of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by the adenovirus E1A oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4481-4486

Lee D., Kim J. W., Seo T., Hwang S. G., Choi E. J. und Choe J. (2002): SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem.* **277**:22330-22337.

Lee D., Lim C., Seo T., Kwon H., Min H. und Choe J. (2002): The viral oncogene HPV E7 deregulates transcriptional silencing by BRG1 via molecular interaction. *J Biol Chem.* **277**: 48842-48848.

Lee D., Sohn H., Kalpana G. V. und Cheo J. (1999): Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**: 487-491.

Lill N., Grossmann S. R., Ginsberg D., DeCaprio J. und Livingston D. M. (1997): Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827.

Lipinski KS, Esche H, Brockmann D. (1998): Amino acids 1-29 of the adenovirus serotypes 12 and 2 E1A proteins interact with rap30 (TF(II)F) and TBP in vitro. *Virus Res.* **54**:99-106.

Lipinski K. S., Kroner-Lux G., Esche H. und Brockmann D. (1997): The E1A N terminus (aa 1-29) of the highly oncogenic adenovirus type 12 harbours a trans-activation function not detectable in the non-oncogenic serotype 2. *J Gen Virol.* **78**: 413-21.

Lipinski K. S., Fax P., Wilker, B. Hennemann H., Brockmann D. und Esche H. (1999): Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology* **255**: 94-105.

Liu R., Liu H., Chen X., Kirby M., Brown P. O. und Zhao K. (2001): Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell* **106**: 309-318.

Liu F. und Green M. R. (1990): A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1A Protein. *Cell* **61**: 1217-1224.

Logie C, Peterson C. L. (1997): Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. *EMBO J.* **16**: 6772-82.

Logie C., Tse C., Hansen J. C. und Peterson C. L (1999): The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochem.* **38**: 2514-2522.

- Londberg-Holm K. und Philipson L. (1969):** Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system. *J. Virol.* **4**: 323-338.
- Lorch Y., Zhang M, Kornberg R. D. (1999):** Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* **96**: 389-92.
- Luo R. X., Postigo A. A. und Dean D. C. (1998):** Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**: 463-473
- Martens J. A. und Winston F. (2003):** Recent advances in understanding chromatin remodeling by SWI/SNF complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 136-142.
- Mayr B. und Montminy M. (2001):** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 599-609.
- Mayr B.M., Canettieri G., Montminy M. R. (2001):** Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 10936-41.
- McKenna N. J, Lanz R. B., O'Malley B. W. (1999):** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr.* **20**:321-44.
- Melkonyan H., Sorg C. und Klempt M. (1996):** Elektroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Res.* **18**: 4356-4357
- Meng X., Yang Y.-F., Cao X., Govindan M. V., Shun M., Hollenberg A. N., Mymryk J. S. und Walfish P. G. (2003):** Cellular context of co-regulator and adaptor proteins regulates human adenovirus 5 E1A dependent gene activation by the thyroid hormone receptor. *Mol. Endoc.* **17**: 1095-105.
- Mermelstein F, Yeung K, Cao J, Inostroza JA, Erdjument-Bromage H, Eagelson K, Landsman D, Levitt P, Tempst P, Reinberg D. (1996):** Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev.* **10**: 1033-48.
- Miller M. E., Carins B. R., Levinston R. S., Yamamoto K. R., Engel D. A. und Smith M. M. (1996):** Adenovirus E1A specifically blocks SWI/SNF-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5737-5743.
- Mizutani T, Ito T, Nishina M, Yamamichi N, Watanabe A, Iba H. (2002):** Maintenance of integrated proviral gene expression requires Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF complex. *J Biol Chem.* **277**(18):15859-15864.
- Montminy M. R. (1997):** Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 807-22.
- Moran E., (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.* **5**: 327-340.

Muchardt C, Yaniv M. (1999): ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol.* **293**:187-98.

Muchardt C, Yaniv M. (1999): The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol.* **10**:189-95.

Muchardt C, Yaniv M. (2001): When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene.* **20**:3067-75.

Myers L. C., Gustafsson C. M., Bushnell D. A., Lui M., Erdjument-Bromage H., Tempst P. und Kornberg R. D. (1998): The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **12**: 45-54.

Mymryk, J. S. und Smith, M. M. (1997): Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem. Cell. Biol.* **75**: 95-102.

Narlikar G. J., Fan H. Y. und Kingston R. E. (2002): Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475-487.

Natarajan K., Jackson B. M., Zhou H., Winston F. und Hinnebusch A. G. (1999): Transcriptional activation by Gcn5 involves independent interaction with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator. *Mol. Cell* **4**: 657-664.

Neely K. E., Hassan A. H., Wallberg A. E., Steger D. J., Carins B. R., Wright A. P. und Workman J. L. (1999): Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell* **4**: 649-655.

Neish A. S., Anderson S. F., Schlegel B. P., Wei W., Parvin JD. (1998): Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* **26**:847-53.

Nie Z, Xue Y, Yang D, Zhou S, Deroo BJ, Archer TK, Wang W. (2000): A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol.* **20**:8879-88.

Norrby E., Bartha A. und Boulanger P. (1976): Adenoviridae. *Intervirology* **7**: 117-125.

Ogryzko V. V, Kotani T., Zhang X., Schiltz R. L., Howard T., Yang X. J., Howard B. H., Qin J. und Nakatani Y. (1998): Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**:35-44.

Owen D. J., Ornaghi P., Yang J. C., Lowe N., Evans P. R., Ballario P., Neuhaus D., Filetici P. und Travers A. A. (2000): The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase GCN5p. *EMBO J.* **19**: 6141-6149.

Owen-Hughes T, Utley R. T., Cote J., Peterson C. L. und Workman J. L. (1996): Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* **273**:513-516.

Papoulas O., Daubresse G., Armstrong J. A., Jin J., Scott M. und Tamkun J. W. (2001): The HMG-domain protein BAP111 is important for the function of BRM chromatin-remodeling complex *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5728-5733.

Pastan I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987): Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins, A. und Oldstone M. B. A., eds.), Springer Verlag, New York, pp. 141-146.

Pazin M. J. und Kadonaga J. T. (1997): SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell* **88**:737-740.

Pazin M. J. und Kadonaga J. T. (1997): What' s up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**:325-328.

Peterson C. L. (2000): ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett.* **476**: 68-72.

Peterson C. L. (2002): Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. Third in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**: 319-22.

Phelan M. L., Schnitzler G. R. und Kingston R. E. (2000): Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI-SNF and its isolated ATPases. *Mol Cell Biol.* **20**: 6380-6389.

Philipson L. (1983): Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 1-53.

Pollard K. J. und Peterson C. L. (1997): Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* **17**: 6212-22.

Puri P. L., Sartorelli V., Yang X. Y., Hamamori Y., Ogryzko V. V., Howard B. H., Kedes L., Wang J. Y., Graessmann A., Nakatani Y. und Levrero M. (1998): Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferase in muscle differentiation. *Mol. Cell.* **1**: 35-45

Rando O. J., Zhao K., Janmey P. und Crabtree G. R. (2002): Phosphatidylinositol-dependent actin filament bindingby the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2824-2829.

Reid J. L., Banister A. J.,Zegerman P., Martinez-Balbas M. A. und Kouzarides T. (1998): E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *EMBO J.* **17**: 4469-447

Reisman D. N., Sciarrotta J., Wang W., Funkhouser W. K, Weissman B. E. (2003): Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res.* **63**: 560-566.

Reisman D. N, Strobeck M. W, Betz B. L, Sciariotta J, Funkhouser W Jr, Murchardt C, Yaniv M, Sherman L. S, Knudsen E. S, Weissman B. E. (2002): Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression. *Oncogene* **21**:1196-207.

Roberts S. M. und Winston F. (1997): Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* **147**: 451-65.

Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovesdi I. und Wickham T. J. (1998): The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**: 7909-7915

Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J, Nakamura T, Croce CM, Mazo A, Canaani E. (1998): The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4152-4157.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaack J. und Shenk T. (1989): Adenovirus terminal protein mediates efficient and timely activation of viral transcription. *Curr Top Microbiol Immunol.* **144**:185-90.

Schaeper U, Boyd J. M, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G. (1995): Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10467-10471.

Schnitzler G. R, Sif S, Kingston R. E. (1998): A model for chromatin remodeling by the SWI/SNF family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **63**:535-543.

Shenk, T. (1996): Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.

Shuen M., Avvakumov N., Walfish P. G., Brandel C. J. und Mymryk J. S. (2002): The adenovirus E1A protein targets the SAGA but not the ADA transcriptional regulatory complex through multiple independent domains. *J. Biol. Chem.* **277**: 30844-30851.

Sif S, Stukenberg P. T, Kirschner M. W, Kingston R. E. (1998): Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.* **12**: 2842-2851.

Sif S., Saurin A. J., Imbalzano A. N. und Kingston R. E. (2001): Purification and characterization of m Sin3A-containing BRG1 and hBRM chromatin remodeling complexes. *Genes Dev.* **15**: 603-618.

Soeth E., Thurber D. B. und Smith C. L. (2002): The viral transactivator E1A regulates the mouse mammary tumor virus promoter in an isoform- and chromatin-specific manner. *J. Biol. Chem.* **277**: 19847-19854.

Sprengel J., Schmtz B., Heuss-Neitzel D., Zock C. und Doerfler W. (1994): Nucleotide sequence of human Adenovirus Type 12 DNA: comparative functional analysis. *J. Virol.* **68**: 379-389.

Sterner D. E., Berger S. L. (2000): Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**: 435-459.

Strahl B. D., Allis C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.

Strobeck M. W., Knudsen K. E. Fribourg A. F. DeCristofaro M. F., Weissman B. E., Imbalzano A. N. und Knudsen E. S. (2000): BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7748-7753.

Strobeck M. W., Reisman D. N., Gunawardena R. W., Betz B. L., Angus S. P., Knudsen K. E. Kowalik T. F., Weissman B. E. und Knudsen E. S. (2002): Compensation of BRG-1 function by Brm: insight into the role of the core SWI-SNF subunits in retinoblastoma tumor suppressor signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 4782-4789.

Strobeck M. W, DeCristofaro M. F, Banine F, Weissman B. E, Sherman L. S, Knudsen E. S. (2001): The BRG-1 subunit of the SWI/SNF complex regulates CD44 expression. *J Biol Chem.* **276**: 9273-9278.

Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, S. und Goff, S. P. (1996): Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1576-1583.

Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F. (2000): Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3364-9.

Sussenbach, J. S. und van der Vliet, P. C. (1983): The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.

Swaminathan S. und Thimmapaya B. (1995): Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 177-194.

Syntichaki P, Topalidou I, Thireos G. (2000): The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* **404**: 414-7.

Thomas G. P, Mathews M. B. (1980): DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell* **22**: 523-33.

Tooze J. (1981): Molecular biology of tumor viruses - part 2, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Torchia J., Glass C. und Rosenfeld M. G. (1998): Co-activators and co-repressor in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 373-383.

Trotman L. C., Mosberger N., Fornerod M., Stidwill R. P. und Greber U. F. (2001): Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 1092-1100.

Trouche D. und Kouzarides T (1996): E2F1 and E1A_{12S} have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1439-1442.

Utley R. T., Cote J., Owen-Hughes T. und workman J. L. (1997): SWI/SNF stimulates the formatin of disparate activator-nucleosome complexes but is partially redundant with cooperative binding. *J. Biol. Chem.* **272**: 12642-12649.

Utley R. T., Ikeda K., Grant P. A., Cote J., Steger D. J., Eber-Harter A., John S. und workman J. L. (1998): Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**: 498-502.

Urnov F. D. und Wolffe A. P. (2001): Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene* **20**: 2991-3006.

van der Eb A. J. und Bernards R. (1984): Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.

Versteeg I., Medjkane S., Rouillard D. und Delattre O. (2002): A key role of the hSNF5/INI1 tumor suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene* **21**: 6403-6412.

Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. (1999): Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet.* **23**: 62-66.

Wadell G. (1984): Molecular epidemiology of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.

Wang W, Chi T, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Crabtree G. R. (1998): Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 492-8.

Wang W., Cote J., Xue Y., Zhou S., Khavari P. A., Biggar S. R., Muchardt C., Kalpana G. V., Goff S. P., Yaniv M., Workman J. L. und Crabtree G. R. (1996): Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* **15**: 5370-5382.

Wang W., Xue Y., Zhou S., Kuo A., Carins B. R. und Crabtree G. R. (1996): Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* **10**: 2117-2130.

Watson J., Hopkins N., Roberts J., Steitz J. und Weitner A. (1987): Molecular biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Melo Park, California, USA.

Weintraub S. J., Prater C. A. und Dean D. C. (1992): Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* **358**: 259-61.

White E. (1995): Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.

Whitehouse I, Flaus A, Cairns BR, White MF, Workman JL, Owen-Hughes T. (1999): Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **400**: 784-787.

Whittaker J. L., Byrd P. J., Grand R. J. A. und Gallimore P. (1984): Isolation and characterisation of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol. Cell Biol.* **4**: 110-116.

Williams J., Williams M., Liu C. und Telling G. (1995): Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**, 149-177

Wolffe A. P. (1995): Centromeric chromatin. Histone deviants. *Curr Biol.* **5**: 452-454.

Wu D. Y., Krumm A. und Schubach W. H. (2000): Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J. Virol.* **74**: 8893-8903.

Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H. und Nakatani Y. (1996): A p300/CBP-associated factor that competes with th adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.

Yuan W., Condorelli G., Caruso M., Felsani A. und Giordano A. (1996): Human p300 protein is a coactivator for the trnscription factor MyoD. *J. Biol. Chem.* **271**: 9009-9013.

Yudkovky N., Logie C., Hahn S. und Peterson C. L. (1999): Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* **13**: 2369-2374.

Zhang H. S., und Dean, D. C. (2001): Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 3134-3138.

Zhang H. S., Gavin M., Dahiya A., Postigo A.A., Ma D., Luo R. X., Harbour J. W. und Dean D. C. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**: 79-89.

8. Publikationen

Hashemi, R., Schmücker, U., Brockmann, D., und Esche, H., (2003): Functional interaction between BRG1 and oncoprotein E1A in the process of CREB-dependent promoter activation. *Zur Publikation eingereicht.*

Brockmann, D., Fax, P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C., und Esche, H. (2001): Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* 3: 277-295.

Aleman, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K.H., Meyer zu Heringdorf, D. (2001): Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* 509: 239-44.

Graupner, S., Frey, V., Hashemi, R., Lorenz, M.G., Brandes, G., Wackernagel, W. (2000): Type IV pilus genes pilA and pilC of *Pseudomonas stutzeri* are required for natural genetic transformation, and pilA can be replaced by corresponding genes from nontransformable species. *J. Bacteriol.* 182: 2184-90.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Rozita Hashemi
Geburtsdatum	14.09.1967
Geburtsort	Teheran/Iran
Familienstand	ledig
Anschrift	Meistersingerstr. 48a, 45307 Essen

Schulausbildung

1972-1977	Grundschule, Teheran
1977-1980	Mittlere Reife, Teheran
1980-1984	Gymnasium, Teheran

Hochschulausbildung

1985-1986	Vorbereitungskurs für die Aufnahmeprüfung an der Universität Teheran/Iran
1986-1988	Studium der Biologie (B. Sc.) an der Universität Bhopal/Indien
1989-1990	Sprachschule Hamburg/Deutschland
1991-1998	Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
1998-1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der biologischen Fakultät der Universität Oldenburg zum Thema „Untersuchungen zur natürlichen DNA-Aufnahme durch <i>Pseudomonas stutzeri</i> und verschiedener transformationsdefekter Mutanten“
10.1999	Abschluss als Diplom Biologin
01.-05.2000	Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Pharmakologie Universitätsklinikum Essen
Seit 06/2000	Wissenschaftliche Angestellte und Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen

Essen, den 09.07.2003

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema:

**„Interaktion von Chromatin-remodellierenden Faktoren mit dem
E1A_{12S}-Onkoprotein des Adenovirus Serotyp 12“**

zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Rozita Hashemi befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. H. Esche)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Rozita Hashemi)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Rozita Hashemi)

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Esche für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Weiterhin möchte ich ihm für seine hervorragende Betreuung und stetige Unterstützung während meiner Promotionszeit danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Brockmann danke ich herzlich für die hilfreichen Diskussionen und die vielfältigen Anregungen, die zum Fortgang dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Ganz lieben Dank gebührt allen ehemaligen und rezenten Laborkollegen für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Zusammenarbeit. Ganz besonders danken möchte ich meinen Kollegen Christiane Nolte und Silke Kullmann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Ulla Schmücker danke ich für ihre hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Im Besonderen danke ich meiner Familie für die immerwährende Unterstützung. Vor allem gilt mein Dank Andreas für seine Liebe, Geduld und sein Verständnis für meine Arbeit.